

ÉTUDE STRUCTURALE DES RIBOREGULATEURS *THIB* ET *THIM*

par

Chaima Bengagi

Mémoire présenté au Département de biologie en vue
de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DES SCIENCES
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, septembre 2020

Le 15 septembre 2020

Le jury a accepté le mémoire de Madame Chaima Bengagi dans sa version finale.

Membres du jury

Professeur Daniel Lafontaine
Directeur de recherche
Département biologie
Université de Sherbrooke

Professeur Pierre-Etienne Jacques
Évaluateur interne
Département biologie
Université de Sherbrooke

Professeur Alexandre Maréchal
Président-rapporteur
Département de biologie
Université de Sherbrooke

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche, Daniel Lafontaine, pour son soutien moral et intellectuel, sa présence et son amitié tout au long de ma maîtrise.

Je remercie également mes conseillers, Alexandre Maréchal et Pierre-Etienne Jacques, qui m'ont aidée dans mes présentations et mes rapports pendant deux ans.

J'aimerais aussi remercier les membres du laboratoire Lafontaine : Anne-Marie, Patrick, Jonathan, Jean-Christophe, Jean-François, Auréliane, Elsa, Anne-Sophie et spécialement Tithi pour m'avoir soutenue tout au long de mon cursus et pour tous les bons moments que nous avons passés ensemble.

Pour finir, j'aimerais remercier ma famille et mes amis qui m'ont soutenue pendant mon parcours et leur exprimer à quel point je leur en suis reconnaissante

SOMMAIRE

L'adaptation de la bactérie à son milieu s'effectue par la régulation de l'expression génétique qui est réalisée pendant l'étape de la transcription, ou pendant l'étape de la traduction. Les protéines jouent un rôle régulateur très important. Nous savons maintenant que les ARN non traduits comme les riborégulateurs sont impliqués aussi dans cette régulation comme c'est le cas également des protéines. Un riborégulateur se trouve dans la partie non codante de l'ARN messager capable de lier un ligand spécifique afin de réguler l'expression de son transcrit. Chez *Escherichia coli* (*E. coli*), trois riborégulateurs lient la thiamine pyrophosphate (TPP) : le riborégulateur *thiB* qui contrôle le transport de TPP, le riborégulateur *thiM* qui encode le gène du sauvetage de TPP et le dernier, le riborégulateur *thiC* qui est parmi les gènes régulant la synthèse de TPP.

Mes travaux de recherche portent sur l'étude de la structure des riborégulateurs *thiB* et *thiM* d'*E. coli*. Dans un premier temps, j'ai étudié la structure de *thiB* par deux approches scientifiques; la première est une méthode chimique (SHAPE) et la deuxième, enzymatique (RNase H). Dans un second temps, j'ai commencé à mettre au point une technique de transcription couplée à des billes pour étudier la structure de *thiM*.

Mots-clés : Riborégulateur, *E. coli*, *thiB*, *thiM*, TPP, régulation, structure, RNase H, SHAPE, bille

TABLE DES MATIÈRES

Chapitre 1.....	1
INTRODUCTION	1
1.1. L'ARN	1
1.1.1. La transcription chez les procaryotes	2
1.1.2. Les riborégulateurs	8
1.1.2.1. Historique	8
1.1.2.2. Définition	8
1.1.2.3. Différentes classes de riborégulateurs	10
1.1.2.4. Modes de régulation des riborégulateurs	15
1.1.3. Riborégulateur de TPP	18
1.1.3.1. La thiamine et la TPP	19
1.1.3.2. La structure secondaire de l'aptamère.....	20
1.1.3.3. La biosynthèse de TPP chez <i>E. coli</i>	23
1.1.4. Objectifs de la maîtrise	26
CHAPITRE 2.....	28
ÉTUDE STRUCTURALE DU RIBORÉGULATEUR <i>thiB</i>.....	28
2.1. Introduction.....	28
2.2. Matériels et méthodes	29
2.2.1. Transcription in vitro	29
2.2.2. Précipitation avec phénol-chloroforme-isoamyl (PCI).....	29
2.2.3. Précipitation avec le trizol.	30
2.2.4. Précipitation avec le Kit GeneJet.....	30
2.2.5. SHAPE	30
2.2.6. DMS	32
2.2.7. Transcription des échelles de séquençage à l'aide de didésoxyribonucléotide. ...	32
2.2.8. . La RNase H	33
2.3. Résultats.....	35
2.3.1. SHAPE et DMS	35

2.3.2. RNase H.....	37
CHAPITRE 3.....	44
ÉTUDE DE L’AFFINITÉ DE <i>thiB</i> VIS-À-VIS DE SON LIGAND	44
3.1. Introduction.....	44
3.2. Matériels et méthodes	44
3.3. Résultats.....	45
CHAPITRE 4.....	50
ÉTUDE STRUCTURALE DU RIBORÉGULATEUR <i>thiM</i>.....	50
4.1. Introduction.....	50
4.2. Matériels et méthodes	51
4.2.1. Préparation des billes NHS.....	51
4.2.2. Transcription fluorescente	52
4.2.3. La technique smFRET	53
4.3. Résultats.....	54
CHAPITRE 5.....	50
DISCUSSION ET CONCLUSION.....	57
ANNEXE	60
BIBLIOGRAPHIE	63

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	Différents types de riborégulateurs.....	11
Tableau 2	les pourcentages de clivage obtenues par les sondes 41 et 63 pour thiB EC-83 et EC-88.....	38
Tableau 3	Les valeurs de KD pour chaque construction tronquée de thiB.....	48
Tableau A1	Amorce radioactivement marquée utilisée pour la technique SHAPE.....	60
Tableau A2	Sondes utilisées pour la technique de RNase H.....	60
Tableau A3	Séquence d'amorce utilisée pour les différentes constructions.....	61
Tableau A4	Amorce utilisée pour les différentes constructions d'ARN.....	62

LISTE DES FIGURES

Figure 1	Schéma représentatif du paradigme de la biologie moléculaire.....	2
Figure 2	Les trois étapes successives de la transcription.....	4
Figure 3	Représentation simplifiée de la polymérase ARN chez E. coli en complexe d'élongation.....	5
Figure 4	Modèle de pause transcriptionnelle.....	6
Figure 5	Schéma simplifié d'un riborégulateur.....	9
Figure 6	Le mode de régulation traductionnelle de thiB.....	16
Figure 7	Le mécanisme de terminaison par Rho.....	18
Figure 8	Représentation schématique de quelques riborégulateurs présents chez E. coli.....	19
Figure 9	Structure chimique du TPP. Tirée de (Serganov et al., 2006).....	20
Figure 10	Structure du riborégulateur de TPP.....	22
Figure 11	La voie de biosynthèse de la thiamine chez E. coli.....	24
Figure 12	Schéma représentant le riborégulateur thiM et l'opéron thiMD.....	25
Figure 13	Structure prédite du riborégulateur thiB (Rodionov et al., 2003).....	28
Figure 14	Principe du SHAPE.....	31
Figure 15	Représentation de dCTP (A) et ddCTP (B).....	33
Figure 16	Représentation schématique du riborégulateur thiM d'E. coli.....	33
Figure 17	Résultat d'un gel de SHAPE natif.....	37
Figure 18	Résultat de RNase H pour thiB-EC-88 avec les sondes 41 et 55.....	39
Figure 19	Résultat de RNase H pour thiB-EC88 avec les sondes 45 et 63.....	40
Figure 20	Résultat de RNase H pour thiB-EC83 avec les sondes 41 et 63.....	41
Figure 21	Détermination du K_{switch}	43
Figure 22	Schéma qui illustre le principe de la cartographie en ligne.....	45

Figure 23	Transcription des tronqués 84, 85, 86 et 87.....	46
Figure 24	Détermination de KD pour la construction du tr84.....	47
Figure 25	Détermination de KD pour la construction du tr86.....	47
Figure 26	Détermination de KD pour la construction du tr87.....	48
Figure 27	Les valeurs de KD pour les complexes d'élongation de <i>thiB</i>	49
Figure 28	Structure de <i>thiM</i> en présence de TPP.....	51
Figure 29	Schéma simplifié de la transcription fluorescente couplée à des billes.....	52
Figure 30	Construction modifiée <i>thiM</i> -105-nt.....	53
Figure 31	Efficacité du FRET (E) en fonction de la séparation entre les fluorophores (Å) (Shaw et al, 2014).....	54
Figure 32	La transcription fluorescente couplée à des billes.....	55

LISTE DES ABRÉVIATIONS ET DES SIGLES

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ARNnc	ARN non codant
ARNm	ARN messenger
ARNpol	ARN polymérase
ATP	Adénosine triphosphate
ATPase	Adénosine triphosphatase
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Éthylènediaminetétraacétique
Facteur σ	Facteur sigma
FMN	Flavine mononucléotide
FRET	Förster Resonance Energy Transfer
HMP	Hydroxy-methyl-pyrimidine
HET	Hydroxy-ethyl-tiazole
KD	Constante de dissociation
KDa	Kilo Dalton
Mg ²⁺	Ion magnesium
NTP	Nucleotide triphosphate
Nt	nucléotide
Pré-Q1	7-aminométhyl-7-déazaguanine
RNase	Ribonucléase
Rut	Rho Utilization Site
SAM	S-adénosyl-méthionine
SAH	S-adénosyl-monocystéine
SD	Shine-Dalgarno

SDS	Dodécylsulfate de sodium
SLR	Site de liaison au ribosome
TPP	Thiamine pyrophosphate
UTR	Untranslated Region
B	beta
μ	micro
σ	sigma
γ	gamma
α	alpha
Ω	Oméga

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1. L'ARN

Avant la deuxième moitié du 20^e siècle, les notions de base de la biologie connues maintenant étaient des énigmes, mais grâce à l'effort des chercheurs, plusieurs découvertes ont été établies et ont enrichi le domaine de l'ARN. En 1953, James Watson et Francis Crick ont publié leur découverte concernant la structure de l'ADN (Crick & Watson, 1953). Après quelques années, l'ARN a été montré comme un intermédiaire entre l'ADN et la protéine. En 1961, un groupe de chercheurs a montré que l'ARNm d'un gène interagira avec un ribosome et sera traduit en protéine (Jacob & Monod, 1961). C'est à cette époque qu'est né le paradigme de la biologie moléculaire (Figure 1).

Le paradigme met en avant le principe selon lequel l'information génétique serait encodée dans l'ADN qui serait par la suite transcrit en ARN messenger pour finalement être traduit en protéine. Le principe du paradigme est limité puisque la plupart des ARN ne sont pas traduits en protéines; il existe des ARN non codants (ARNnc). Chez l'homme, par exemple, l'étude de 1 % du génome humain a montré que 90 % de ce dernier était transcrit (Birney *et al.*, 2007), mais que seulement une faible proportion des transcrits (1,5 %) était traduite en protéines. Ainsi, il a été suggéré qu'une partie importante des transcrits restants (88,5 %) pouvait constituer la source de nouveaux ARN non codants régulateurs (Derrien & Guigó, 2011). Dans mon projet, nous nous intéressons aux ARNnc chez les bactéries : les riborégulateurs.

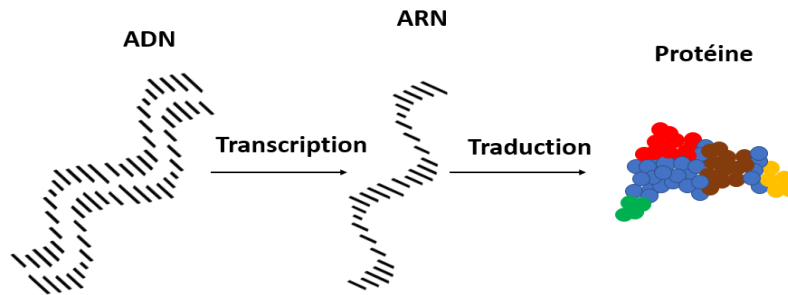


Figure 1 : Schéma représentatif du paradigme de la biologie moléculaire. L'ADN est la matrice contenant toute l'information génétique. Elle est transcrite en une copie temporaire : l'ARN messenger. Ce messenger est alors traduit en protéine.

1.1.1. La transcription chez les procaryotes

La transcription est la première étape de l'expression des gènes chez les procaryotes. Il s'agit de copier la séquence d'ADN d'un gène pour fabriquer une molécule d'ARN. Cet ARN peut être un ARN messenger (ARNm), qui sera par la suite traduit en protéine, ou un ARN non codant (ARNnc) tels que les ARN ribosomiaux (ARNr), les ARN de transfert (ARNt) ou autres. La transcription comporte trois étapes : l'initiation, l'élongation et la terminaison (Figure 2). La transcription est effectuée par des enzymes appelées ARN polymérases. Ces dernières relient les nucléotides pour former un brin d'ARN en utilisant un brin d'ADN comme modèle. Les procaryotes transcrivent tous leurs gènes en utilisant de l'ARN polymérase. Chez *E. coli*, l'ARN polymérase est une protéine oligomérique constituée de six sous-unités (Browning & Busby, 2016). Cinq d'entre elles ($\alpha_2\beta\beta'\omega$) s'associent de manière stœchiométrique pour constituer l'holoenzyme (Figure 3). Elle est de forme irrégulière et l'un des bords est creusé d'un sillon assez long pour adapter un ADN bicaténaire de 16 paires de bases (Ma *et al.*, 2016). La sous-unité β' lie l'ADN à l'holoenzyme et la sous-unité β fait partie du site actif. Cette dernière est impliquée dans l'initiation et l'allongement, tandis que $\sigma 70$ joue un rôle clé dans l'initiation de la transcription en dirigeant l'enzyme vers le promoteur. Il existe deux sous-unités monomères de type α formant un homo-dimère α_2 qui ne participe pas directement à l'activité catalytique de l'enzyme (aucun résidu de ce dimère n'atteint le site actif de l'enzyme). Les deux sous-unités

monomériques permettent d'ancrer et d'assembler deux sous-unités catalytiques dites β et β' . Chacune contacte un seul des monomères α et elles interagissent largement entre elles. La sous-unité ω ne contacte que la sous-unité β , s'enroulant autour de son extrémité C-terminale, suggérant que ω joue un rôle dans les étapes finales de l'assemblage de l'ARN polymérase bactérienne (Zhang *et al.*, 1999). Chaque cellule bactérienne peut contenir plusieurs éléments σ alors que ω ne compte que moins d'un exemplaire par molécule d'enzyme (Rothman-Denes, 2013).

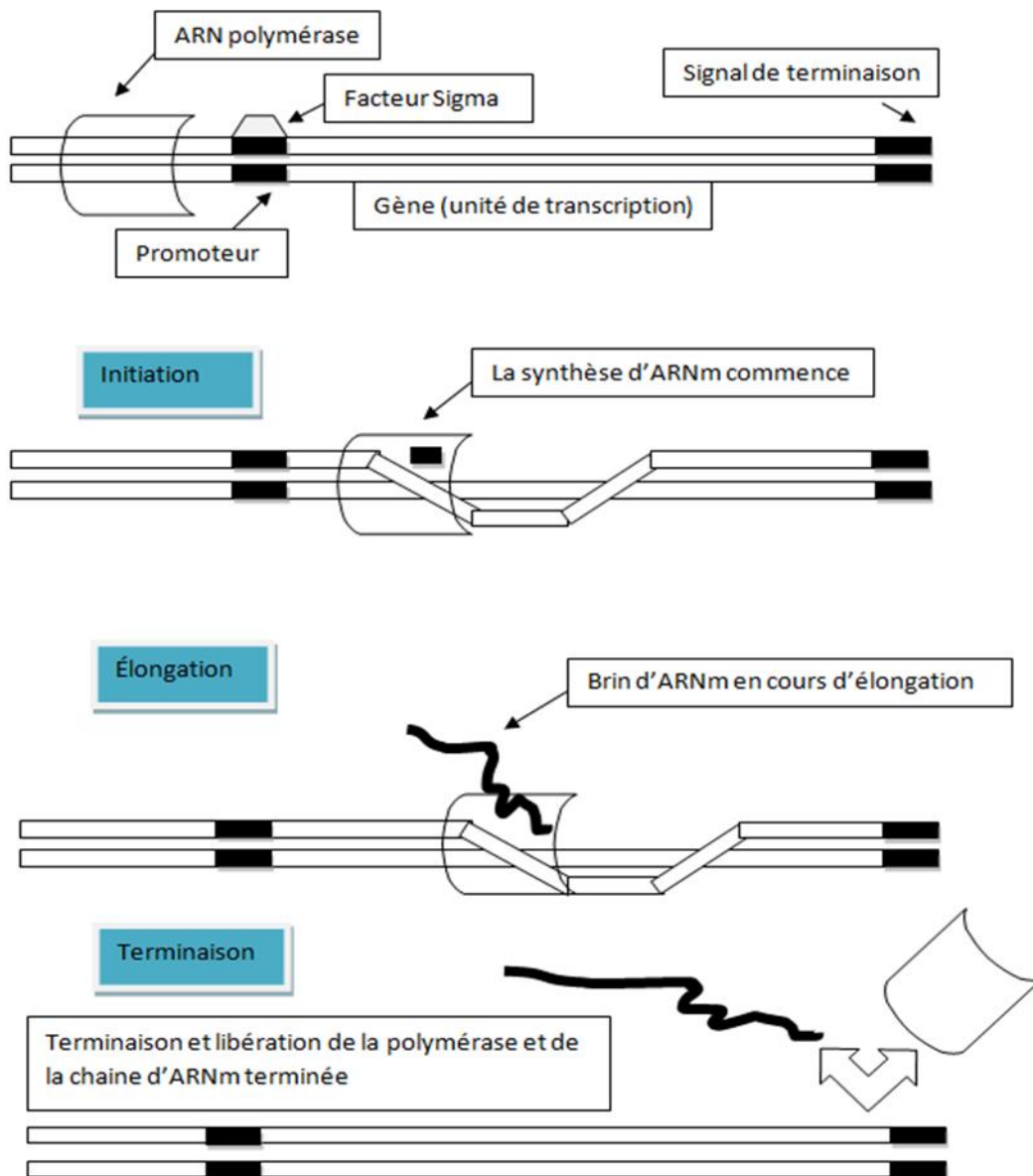


Figure 2 : Les trois étapes successives de la transcription. L'initiation s'effectue donc au niveau du promoteur auquel l'ARN polymérase se fixe. Durant la phase d'élongation, le complexe enzymatique synthétise alors le brin d'ARN complémentaire du brin matrice. Au fur et à mesure qu'elle avance sur le brin matrice, l'ARN polymérase continue de dérouler les deux brins d'ADN. La terminaison de la transcription se produit lorsque la transcription est complétée, alors le transcrit naissant est relâché de l'ARN polymérase.

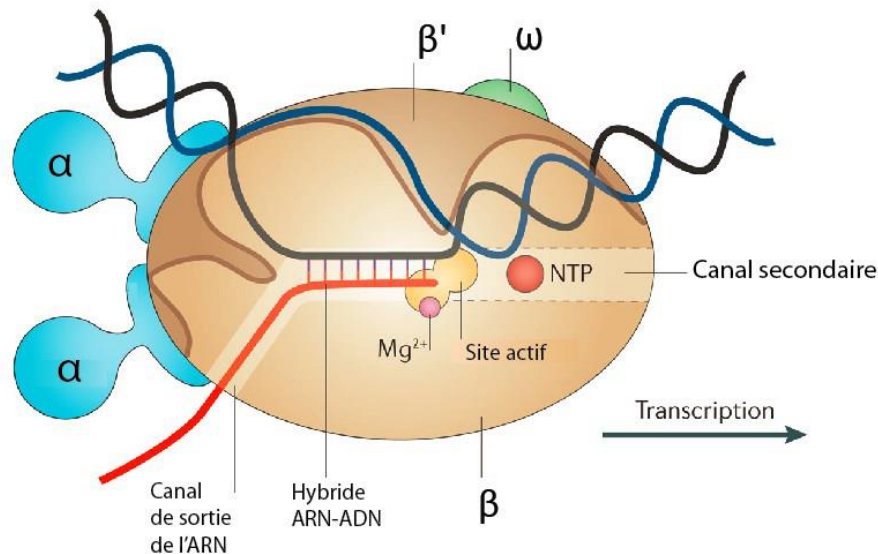


Figure 3 : Représentation simplifiée de la polymérase ARN chez *E. coli* en complexe d'élongation. Les différentes sous-unités s'assemblent afin de créer une polymérase active avec toutes ses caractéristiques, dont les différents canaux. Adapté de (Santangelo & Artsimovitch, 2012).

Durant la phase d'initiation de la transcription, l'ARN polymérase, un complexe protéique, se fixe sur une région particulière de l'ADN, située en amont du gène à transcrire : le site promoteur. Les promoteurs procaryotes possèdent deux régions importantes, soit la région -35 et la région -10. Ces deux régions ont comme séquence consensus TTGACA et TATAAT qui sont les sites de reconnaissance de l'ARN polymérase. La polymérase peut se lier à l'ADN de façon non spécifique et se déplacer en direction 5'-3'. La séquence est analysée jusqu'au moment où une séquence promotrice est trouvée (Kuznedelov *et al.*, 2002).

La liaison entre l'ADN et l'ARN polymérase permet à la sous-unité σ de l'ARNpol d'ouvrir la double hélice d'ADN. Le brin matrice d'ADN est exposé, ce qui permet à l'enzyme de débiter la synthèse d'un ARN par l'insertion des ribonucléotides 5'-triphosphate (rNTP) liés à un ion

Mg²⁺ qui entrerait par le tunnel secondaire (Willey, 2008). L'élongation de la transcription correspond à l'incorporation des nucléotides sur le brin d'ARN. Durant cette phase, l'ARN polymérase progresse de manière séquentielle de l'extrémité 3' vers l'extrémité 5' du brin d'ADN codant, c'est-à-dire le brin complémentaire de l'ARN. L'incorporation des nucléotides se fait par complémentarité entre nucléotides et le brin matrice de l'ADN. L'ARN synthétisé est une copie conforme de la région à transcrire. Au moment de la transcription, l'ARNpol peut effectuer un arrêt temporaire. Ce phénomène est appelé une pause transcriptionnelle caractérisée par le changement de la conformation du site actif de l'ARNpol. Ce dernier joue un rôle important dans la transcription par la fixation du brin matrice de l'ADN à l'ARN polymérase. Ce changement peut causer plusieurs événements tels que la terminaison, l'arrêt ou l'élongation de la transcription (Weixlbaumer *et al.*, 2013). Il existe différents types de pauses classées selon le signal induisant l'arrêt momentané (Figure 4).

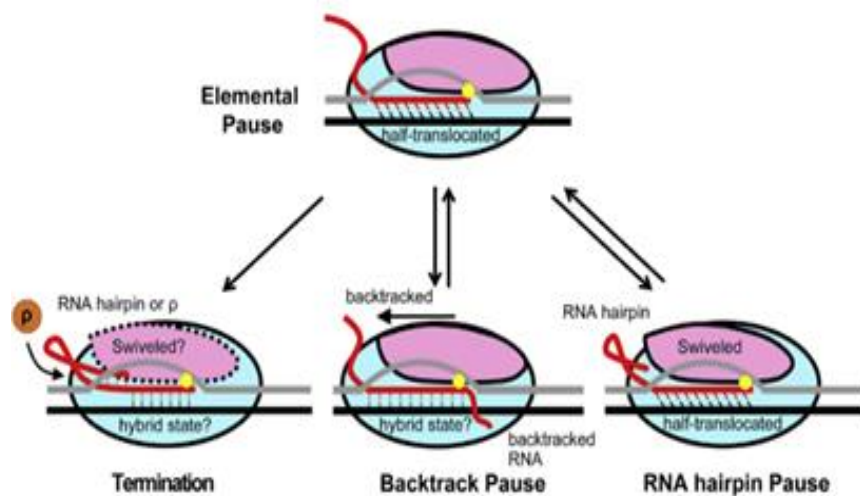


Figure 4 : Modèle de pause transcriptionnelle. L'état de pause élémentaire (ePEC) se caractérise par une ouverture de la pince fixatrice de l'ADN (clamp) et un élargissement du canal de sortie de l'ARN. Cet état peut s'isomériser dans des états de pause à durée de vie plus longue, telles des pauses stabilisées en « backtrack » et en tige boucle, ou encore précéder la terminaison de la transcription par la présence de la protéine Rho qui provoque la coupure de l'hybride ARN-ADN d'où le relâchement de l'ARN adapté de Kang *et al.*, 2019.

- **Pause de type tige-boucle**

La pause de type tige-boucle est le premier type de pause à avoir été découvert. Il se caractérise par la formation de tige-boucle au niveau de l'ARN synthétisé qui peut provoquer la pause de l'ARNpol (Artsimovitch & Landick, 2000). Le contact entre la polymérase et l'ARN provoque le changement conformationnel du site catalytique (site actif) de l'ARNpol (Touloukhonov & Landick, 2004). Différents facteurs entrent en jeu afin de définir la pause comme la taille de la tige d'environ 11 nucléotides d'ARN, soit la distance entre l'ARNpol et la tige ou bien le type de nucléotide où se situe la pause, qui est généralement l'uracile (Chan & Landick, 1993 ; Chan *et al.*, 1997).

- **Pause de type « backtrack »**

Au cours de l'élongation, l'ARNpol n'avance pas dans une seule direction. Le « backtrack » est un mouvement en arrière de l'ARNpol sur la matrice d'ADN provoquant un désengagement de l'extrémité 3' de l'ARN du site catalytique de l'enzyme (Komissarova & Kashlev, 1997a). L'instabilité de l'hybride ADN-ARN au niveau de la transcription provoque la pause de type « backtrack » (Kireeva & Kashlev, 2009). Cet état est connu pour induire l'inactivation du complexe, c'est-à-dire l'arrêt de la transcription (Komissarova & Kashlev, 1997b). Cette pause est causée par l'absence du nucléotide à incorporer ou par une erreur de transcription. L'erreur est corrigée par le clivage de ce transcrit (Marr & Roberts, 2000). Deux facteurs omniprésents, GreA et GreB (Opalka *et al.*, 2003), contribuent à cette correction (Borukhov *et al.*, 1993). Chez *E. coli*, ces deux protéines paralogues sont capables de se lier près du canal secondaire de l'ARNpol et de provoquer le clivage de la partie extrudée en 3' du transcrit d'ARN. GreB peut cliver l'ARN extrudé d'une longueur d'environ 18 nucléotides, restaurant ainsi l'extension par l'ARNpol, tandis que GreA ne peut couper que 2 à 3 nucléotides et sera plus impliqué dans la prévention précoce de la translocation par transcription inverse (Borukhov *et al.*, 2005; Rutherford *et al.*, 2007).

1.1.2. Les riborégulateurs

1.1.2.1. Historique

Jusqu'aux années 1990, les chercheurs ne pensaient pas que l'ARN était capable de lier un métabolite. Autrement dit, seules les protéines étaient considérées comme ayant la capacité de reconnaître d'autres molécules grâce à leur structure. La découverte des ribozymes qui possèdent une fonction catalytique a mené les chercheurs à penser qu'il y avait d'autres ARN possédant la capacité de fixer des molécules (Soukup & Breaker, 1999). On peut trouver des ARN qui possèdent d'autres fonctions. À ce moment-là, et plus précisément en 2002, le groupe du Pr. Ronald Breaker et celui du Pr. Evgeny Nudler ont découvert une nouvelle classe d'ARN régulateurs : les riborégulateurs (Mironov *et al.*, 2002; Winkler *et al.*, 2002).

1.1.2.2. Définition

Les riborégulateurs sont des séquences d'ARN très structurées retrouvées dans la partie non traduite (5'UTR) des ARNm bactériens. Ces ARN sont composés de deux domaines distincts : l'aptamère et la plateforme d'expression (Figure 5).

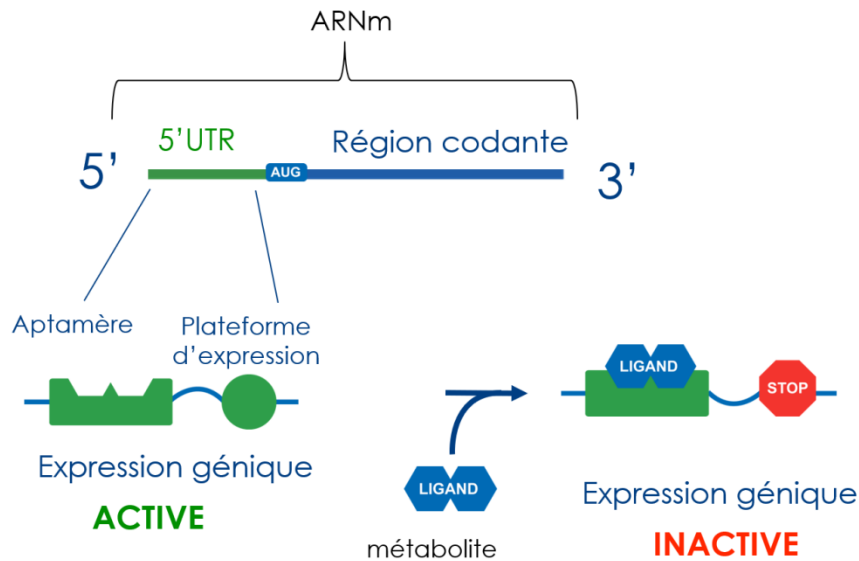


Figure 5 : Schéma simplifié d'un riborégulateur. L'aptamère est responsable de la liaison de son ligand spécifique qui est un métabolite. À la suite de la liaison du ligand, il y aura un changement de structure au niveau de la plateforme d'expression. Cette dernière joue le rôle de modulateur de l'expression génique. La liaison du métabolite provoque l'activation ou l'inactivation du gène, tout dépendant du type du riborégulateur. Autrement dit, la liaison du ligand peut causer une inhibition de l'expression génique (Mandal *et al.*, 2004).

- **L'aptamère** : L'aptamère a généralement une structure secondaire complexe, et c'est le repliement de l'ARN en cette structure qui permet la liaison spécifique d'une certaine molécule et pas d'une autre (Nahvi *et al.*, 2002). En effet, la structure adoptée par l'aptamère diffère selon la présence ou l'absence de la molécule cible, ce qui induit la présence de deux conformations compétitives (liée et non liée) (Nudler, 2013; Winkler *et al.*, 2002). La séquence d'un aptamère a généralement une longueur allant de 70 à 170 nucléotides (Mandal *et al.*, 2003; Winkler *et al.*, 2003). La séquence d'un riborégulateur donné peut changer, mais la structure est fortement conservée parmi les organismes. C'est sur ce principe qu'est basée « la covariance », soit la variation des séquences qui constituent les paires de base, utilisées dans les méthodes bio-informatiques pour chercher de nouveaux riborégulateurs (Havill *et al.*, 2014). C'est la structure

de l'aptamère qui détermine à quelle classe chaque riborégulateur appartient et, plus précisément, le ligand qu'il lie (Serganov, 2009).

- **La plateforme d'expression** : La plateforme d'expression est la partie directement impliquée dans la régulation génique. Le changement conformationnel de la structure de la plateforme est sous l'influence de l'aptamère selon s'il est lié ou non à son ligand spécifique. Selon le mécanisme d'action du riborégulateur, ce domaine peut se replier en une architecture différente : comme un terminateur de transcription ou une tige qui séquestre le site de liaison du ribosome, ce qui fait que la plateforme d'expression d'un riborégulateur donné est moins conservée que l'aptamère en séquence et en structure (Winkler *et al.*, 2002).

1.1.2.3. Différentes classes de riborégulateurs

Actuellement, 38 classes de riborégulateurs sont connues (Mccown *et al.*, 2017). Les classes des riborégulateurs sont regroupées selon le type de ligand reconnu par l'aptamère (voir la section 1.1.2.2 sur la partie aptamère). Il peut s'agir d'acides aminés ou de dérivés (glutamine, lysine et glycine), de coenzymes (thiamine pyrophosphate, adénosyl cobalamine, flavine mononucléotide, cofacteur molybdène, cofacteur tungstène, tétrahydrofolate, S-adénosyl-méthionine, S-adénosyl-homocystéine), de bases azotées classiques ou de substitués (adénine, pré-queuosine 1, etc.), d'ions inorganiques (magnésium, fluorure), d'autres types de molécules (glucosamine-6-phosphate, ARN de transfert, aminoglycosides) ou même de paramètres physicochimiques (température et pH). Il existe certains cas où des ligands sont reconnus par plusieurs classes de riborégulateurs comme c'est le cas chez les riborégulateurs liant le SAM et le pre-Q1 (Lieberman & Wedekind, 2012). Le tableau 1 présente les différents types de riborégulateurs.

Tableau 1 : Différents types de riborégulateurs

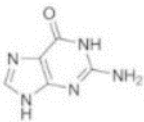
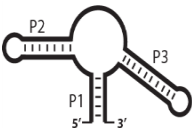
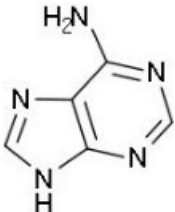
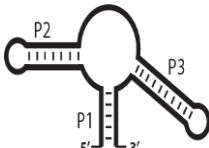
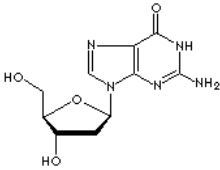
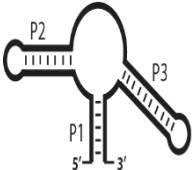

Type de ligand	Ligand	Ligand/fonction biologique	Classe de riborégulateur	Structure secondaire de l'aptamère
Bases azotées et substitués	Guanine	 <p>Composante de l'ADN et de l'ARN</p>	Purine/G (Mandal <i>et al.</i> , 2003)	
	Adénine	 <p>Composante de l'ADN et de l'ARN</p>	Purine/A (Mandal & Breaker, 2004)	
	2' désoxyguanosine	 <p>Analogue de la guanosine</p>	Purine/2'dG (Kim <i>et al.</i> , 2007)	
	Pre-queuosine1		Pre-Q1-I (Roth <i>et al.</i> , 2007)	

Tableau 1 : Suite

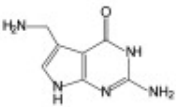

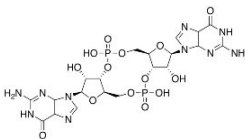
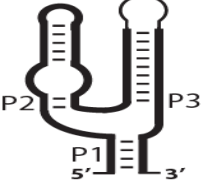
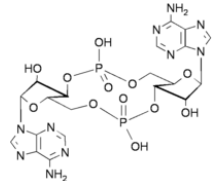
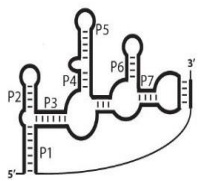
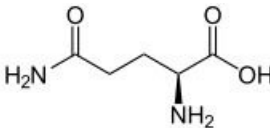
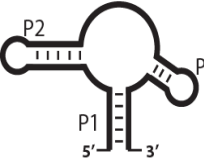
		 <p>Intermédiaire dans la biosynthèse de la queuosine.</p>	Pre-Q1-II (Meyer <i>et al.</i> , 2008)	
	C-di-GMP	 <p>Second messenger</p>	c-di-GMP (Sudarsan <i>et al.</i> , 2008)	
	C-di-AMP	 <p>Second messenger</p>	c-di-AMP (Nelson <i>et al.</i> , 2013)	
Acides aminés et dérivés	Glutamine	 <p>Composante des protéines</p>	Glutamine (Ames & Breaker, 2011)	

Tableau 1 : Suite

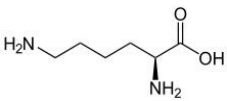
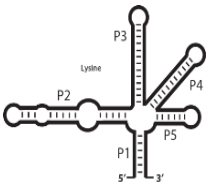
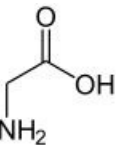
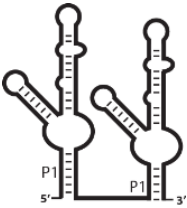
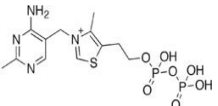
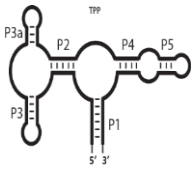
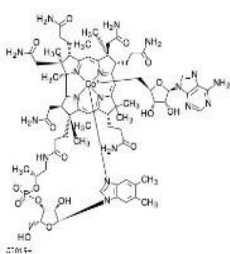
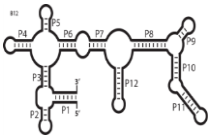
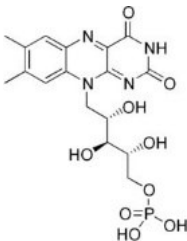
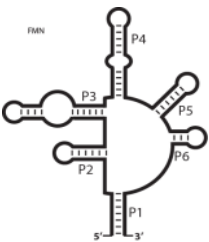
	Lysine	 <p>Composante des protéines</p>	Lysine (Narasimhan <i>et al.</i> , 2003)	
	Glycine	 <p>Composante des protéines</p>	Glycine (Mandal <i>et al.</i> , 2004)	
Coenzymes	Thiamine pyrophosphate	 <p>Décarboxylation</p>	TPP (Winkler <i>et al.</i> , 2002)	
	Adénosyl cobalamine	 <p>Transméthylation</p>	AdoCbl (Nahvi <i>et al.</i> , 2002)	
	Flavine mononucléotide	 <p>Oxydoréduction</p>	FMN (Mironov <i>et al.</i> , 2002)	

Tableau 1 : Suite

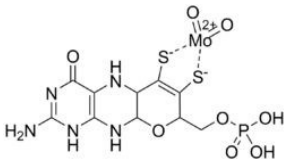
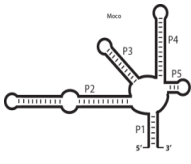
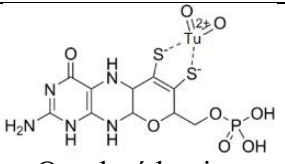
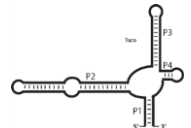
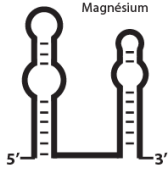
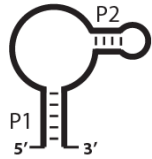

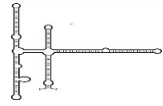
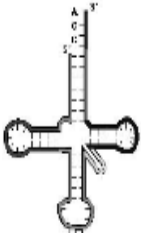
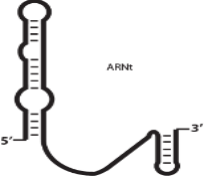
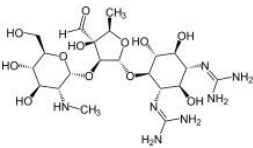
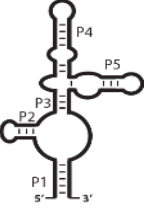
	Cofacteur molybdène	 <p>Oxydoréduction</p>	Moco (Regulski <i>et al.</i> , 2008)	
	Cofacteur tungstène	 <p>Oxydoréduction</p>	Tuco (Regulski <i>et al.</i> , 2008)	
Ions Inorganiques	Magnésium	Essentiel à plusieurs réactions chimiques	Mg ²⁺ (Cromie <i>et al.</i> , 2006)	
	Fluorure	Ion toxique	F ⁻ (Baker <i>et al.</i> , 2012)	
Paramètres physicochimiques	Température		Température (Morita <i>et al.</i> , 1999)	
	pH		pH (Nechooshtan <i>et al.</i> , 2009)	

Tableau 1 : Suite

Autres	ARN de transfert non chargé	 Synthèse des protéines	ARNt (Grundy <i>et al.</i> , 2002)	 ARNt
	Aminoglycoside	 Antibiotique	Aminoglycoside (Jia <i>et al.</i> , 2013)	 P1, P2, P3, P4, P5

1.1.2.4. Modes de régulation des riborégulateurs

1.1.2.4.1. Régulation traductionnelle

Chez certains riborégulateurs, un mécanisme nommé régulation traductionnelle est utilisé. Cette régulation consiste en un changement de conformation de la plateforme d'expression à la suite de la liaison du ligand. Ce changement de conformation mène à la formation d'une tige qui séquestre le SLR et empêche ainsi l'initiation de la traduction (Caron *et al.*, 2012). Ce mécanisme de régulation est simple à prédire puisque la liaison du ligand provoque la formation d'un motif qui se repère facilement, soit une tige-boucle d'ARN où sont séquestrés la séquence de site de liaison au ribosome (SLR) et le codon d'initiation. Lorsque ces signaux sont séquestrés, le ribosome ne peut pas les lier sur l'ARN et initier la traduction (Breaker, 2012)(Figure 6).

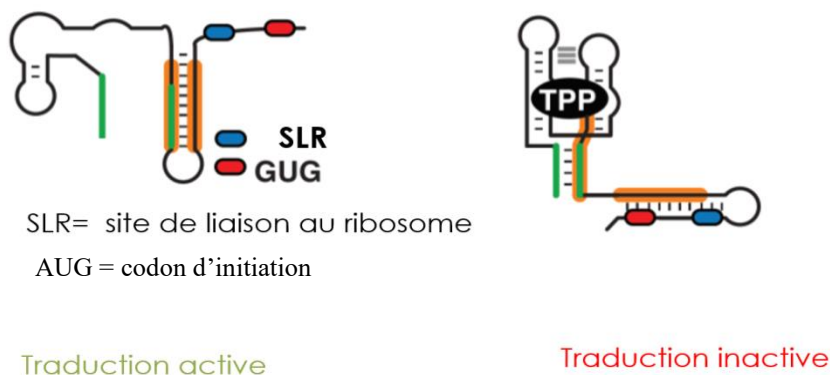


Figure 6 : Le mode de régulation traductionnelle de thiB. Lorsque la traduction est active, le site de liaison et le codon d'initiation sont accessibles par le ribosome. Lorsque la traduction est inactive, le codon d'initiation et SLR sont séquestrés dans une tige boucle qui inhibe la liaison du ribosome adapté de (Chauvier *et al.*, 2017).

1.1.2.4.2. Terminaison intrinsèque

La terminaison intrinsèque est le mécanisme de terminaison le plus abondant chez les bactéries (Henkin *et al.*, 2003). La transcription du terminateur canonique provoque la terminaison de la transcription. Ce terminateur est constitué d'une tige boucle suivie d'une séquence poly-U d'environ neuf résidus uraciles (Reynolds *et al.*, 1992). En effet, au moment où la polymérase arrive à la transcription d'un terminateur, une pause s'impose. Cette pause se traduit après par le décrochage de la polymérase de l'ADN. Deux modèles sont proposés pour expliquer ce phénomène : le modèle de translocation et le modèle allostérique. La formation de la tige boucle applique une force qui tire sur l'ARN, où il y a donc translocation. Autrement dit, cette force cause le déplacement de la polymérase en aval, ce qui l'empêche de finir la transcription (Santangelo & Roberts, 2004). Le deuxième modèle suggère qu'au moment de la formation de la tige, un changement se produit au niveau de la polymérase. La polymérase perd sa stabilité et se libère facilement de l'ADN (Epshtein *et al.*, 2007).

1.1.2.4.3. Régulations par la protéine Rho

La protéine Rho est un hexamère de 274,6 kDa de six sous-unités identiques. Chaque sous-unité a un domaine de liaison à l'ARN et un domaine d'hydrolyse de l'ATP. Cette protéine a été découverte par J.W Roberts en 1969 (Roberts, 1969) qui a mis en évidence son activité ATPase et hélicase au moment de la liaison à l'ARN. L'activité hélicase consiste en l'utilisation de l'énergie d'hydrolyse de l'ATP ou du GTP pour catalyser l'ouverture d'acides nucléiques (ADN ou ARN) appariés sous forme double brins. Chez *E. coli*, 20 à 30 % du génome est modulé par la protéine Rho pour favoriser la terminaison de la transcription (Kriner *et al.*, 2016). Le terminateur Rho-dépendant se compose de deux domaines pouvant contenir plus de 200 paires de bases. Le site en amont, au niveau de l'ARN, est reconnu par la protéine homohexamérique Rho, on le nomme ainsi « rut » (Rho-utilization site). La séquence rut mesure au moins 40 nucléotides, est riche en cytosine, pauvre en guanine et peu structuré (Chalissery *et al.*, 2007). Rho utilise son activité ATPase afin de se déplacer en direction 5'→3' sur le transcrit naissant, où il rejoint le complexe d'élongation au deuxième domaine de terminaison de la transcription au niveau de l'ARN. Ce domaine de terminaison est peu défini, mais on sait qu'il correspond, en général, à un site de pause de l'ARN polymérase (Jin *et al.*, 1992). Le relâchement de l'ARN naissant du complexe d'élongation est possiblement dû à l'activité hélicase de la protéine Rho sur les hybrides ARN-ADN (Eddy, 2001) (Figure 7).

Les domaines N-terminaux de chaque protomère Rho comprennent un site de liaison primaire (PBS)

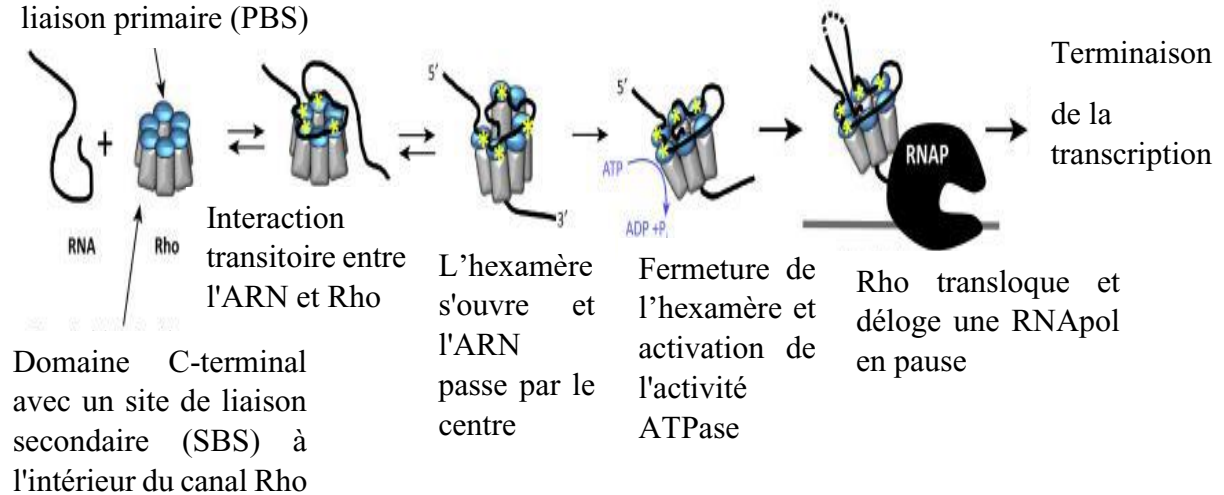


Figure 7 : Le mécanisme de terminaison par Rho. La protéine Rho se lie à l'ARN non traduit sur un site riche en C (site rut). La liaison du site rut par la protéine Rho est réalisée par le domaine de liaison N-terminal, aussi appelé primaire. Puis, il y a liaison de l'ARN au site de liaison secondaire. Les sites secondaires liés à l'ARN activent l'hydrolyse de l'ATP. L'énergie dérivée de l'hydrolyse de l'ATP alimente l'activité translocase/hélicase de Rho pour dérouler le duplex d'ARN/ADN (Mitra *et al.*, 2017).

1.1.3 Riborégulateur de TPP

Chez *E. coli*, il y a actuellement 11 riborégulateurs identifiés et confirmés expérimentalement (Figure 8).

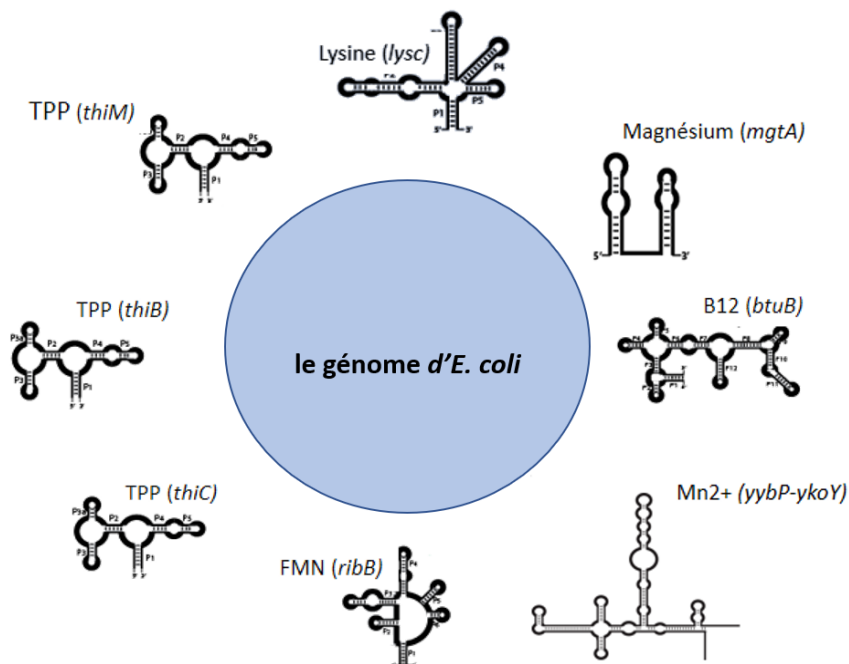


Figure 8 : Représentation schématique de quelques riborégulateurs présents chez *E. coli*.

1.1.3.1 La thiamine et la TPP

La thiamine est un dérivé de la vitamine B1. Elle est synthétisée chez les plantes, les champignons et les bactéries, mais pas chez les vertébrés, donc ceux-ci l'obtiennent par l'alimentation. La thiamine est un cofacteur essentiel d'enzymes impliquées dans le métabolisme des glucides (Ciszak *et al.*, 2003). La thiamine est une vitamine hydrosoluble composée d'un groupement pyrimidine et d'un groupement thiazole relié par un groupement méthylène. La thiamine pyrophosphate (TPP), parfois aussi nommée thiamine diphosphate, est la forme active de la thiamine (Figure 9) (Miranda-Ríos, 2007). La TPP est le cofacteur de nombreuses enzymes importantes impliquées dans plusieurs voies métaboliques telles que la glycolyse et le cycle de Krebs (Bettendorff & Wins, 2009).

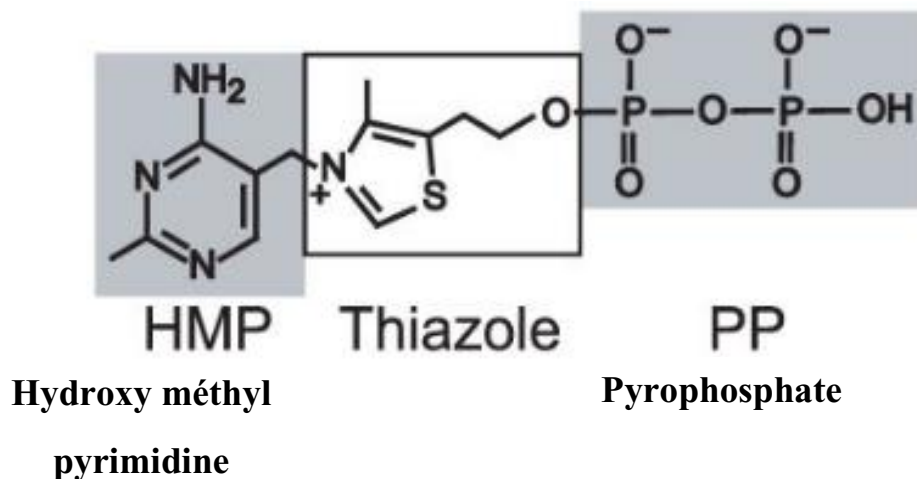


Figure 9. Structure chimique du TPP. Tirée de (Serganov *et al.*, 2006).

1.1.3.2 La structure secondaire de l'aptamère

Chaque riborégulateur possède un aptamère qui lie son ligand de façon spécifique, comme c'est le cas pour l'aptamère du riborégulateur TPP (ou thi-box). L'étude de la structure de l'aptamère est alors importante pour comprendre ce phénomène de la liaison spécifique du ligand à l'aptamère. Différents scientifiques ont travaillé sur la structure cristalline de l'aptamère de TPP. La première équipe a cristallisé le riborégulateur *thiC* d'*Arabidopsis thaliana* (Thore, Leibundgut, & Nenad, 2006). La deuxième a cristallisé le riborégulateur *thiM* d'*E. coli* (Serganov *et al.*, 2006). Quant à la troisième, elle a aussi cristallisé le riborégulateur *thiM* d'*E. coli*, mais en présence d'analogues de la TPP, cette fois, afin de mieux comprendre comment le riborégulateur différencie la TPP d'autres molécules similaires (Edwards & Ferré-D'Amaré, 2006).

La structure globale de la boîte THI ressemble à un diapason dans lequel les dents sont formées par deux hélices d'empilage parallèles (P2, renflement J3-2, P3 et boucle L3) et (P4, renflement J4-5, P5 et boucle L5) disposés via une jonction centrale à trois voies avec l'hélice P1 (Figures 10A et B)(Miranda-Ríos, 2007).

Chacune des hélices parallèles a une fonction dans la liaison d'une partie du TPP. L'hélice P2 / J3-2 / P3 / L3 est impliquée dans la liaison de la fraction pyrimidine, et l'hélice P4 / J4-5 / P5 / L5 se lie au groupe pyrophosphate (Padhi *et al.*, 2019). La partie pyrimidine du TPP est liée par le renflement J3-2 situé dans l'hélice du capteur de pyrimidine P2-P3 qui contient la séquence conservée UGAGA. Les résidus U39 et A43 forment une paire de bases trans-Watson-Crick / Hoogsteen qui provoque l'extrusion des résidus G40, A41 et G42, formant un motif de boucle en T de type I. Le cycle pyrimidine est maintenu entre les résidus G42 et A43 (présents dans une conformation endo C2') au moyen de forces d'empilement et de la formation de deux liaisons hydrogène avec le résidu G40 et d'une liaison hydrogène entre la position N1 du cycle pyrimidine du TPP et le 2' d'oxygène du résidu G19 (Figure 10 E). Une stabilisation supplémentaire est obtenue par la formation d'une paire de triplets : (G19 • A47) • G42 et (G18-C48) • A41 (Serganov *et al.*, 2006).

Le groupe pyrophosphate de TPP est reconnu par la boucle interne J4-5 présente dans l'hélice du capteur de pyrophosphate P4 / P5 grâce à une interaction avec les cations divalents et leurs molécules d'eau coordonnées correspondantes (Figure 10). Dans la structure publiée par Serganov et al., 2006, on trouve deux ions Mg^{2+} au voisinage du groupe phosphate : MA et MB. MA interagit avec les résidus G60 et G78, ce dernier étant le seul résidu à interagir avec le groupement pyrophosphate ainsi qu'avec les résidus U59, A61 et C77 via des molécules d'eau. L'autre ion magnésium, MB, interagit avec les nucléotides A75, G76 et C77 à travers des molécules d'eau (Figure 10C).

Deux interactions tertiaires dans le riborégulateur TPP sont essentielles afin de rapprocher les deux hélices, ce qui permet de positionner les domaines reconnaissant l'anneau pyrimidine et la portion pyrophosphate. Premièrement, les résidus A69, A70 et U71 situés dans la boucle L5 interagissent avec les résidus G21, C38 et U39 à la base de la tige P3 (Figure 10 D). Deuxièmement, la formation d'un entortillement (*kink*) au niveau du résidu A53, dans la jonction J2-4, permet l'alignement parallèle des deux hélices. Le nucléotide très conservé A84 joue un rôle crucial dans la formation de ce *kink*. Celui-ci est provoqué par la formation d'une paire de tétrades empilées, où les paires de bases non canoniques A56•G83 et A53•A84 sont alignées de deux paires de bases G-C consécutives, dans le sillon mineur de la tige P2. Le *kink*

est stabilisé par un arrangement particulier de la jonction à 3 voies, où le résidu A84 forme des liaisons hydrogène avec G16 et C50 et où A84 est empilé entre les résidus A56 et G51 (Figure 10E) (Miranda-Ríos, 2007).

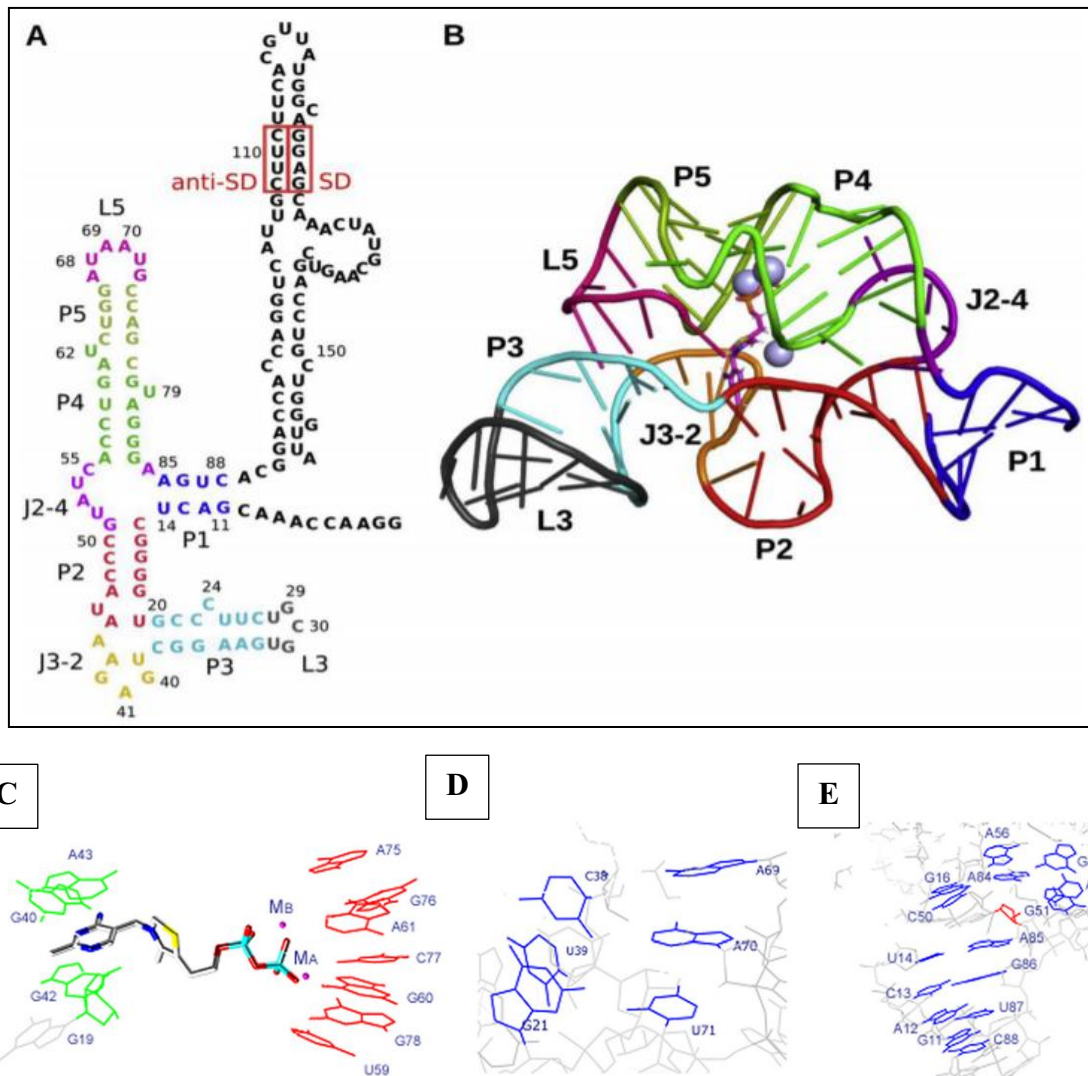


Figure 10 : Structure du riborégulateur de TPP. A) Structure secondaire du riborégulateur. La plateforme d'expression est représentée en noir et les différentes régions de l'aptamère sont représentées en couleurs distinctes. « SD » désigne la séquence Shine-Dalgarno (site de fixation du ribosome) et « anti-SD », la séquence anti-Shine-Dalgarno. B) Structure cristalline. C) On

observe la reconnaissance de la portion pyrimidine par l'hélice P2-3 et de la portion pyrophosphate par l'hélice P4-5 via les ions magnésium MA et MB. Les structures D et E du riborégulateur représentent les interactions tertiaires importantes dans le riborégulateur TPP, soit en D, les interactions hélice-boucle entre P3 et L5 et en E, le *kink* dans la jonction 2-4 (Miranda-Ríos, 2007, Padhi *et al.*, 2019).

1.1.3.3 La biosynthèse de TPP chez *E. coli*

Plusieurs gènes sont impliqués dans la biosynthèse de la TPP (Figure 11). L'un d'entre eux est requis pour la biosynthèse du groupement pyrimidine (*thiC*), sept sont impliqués dans la formation du groupement thiazole (*thiF*, *thiS*, *thiG*, *thiH*, *thiI*, *dxs* et *iscS*), un est requis pour le couplage des deux groupements (*thiE*), trois encodent des kinases impliquées dans le sauvetage de la thiamine (*thiM*, *thiD*, et *thiK*) et un dernier encode la kinase responsable de la formation de TPP à partir de thiamine phosphate (*thiL*). Chez *E. coli*, trois riborégulateurs TPP, *thiC* *thiM* et *thiB*, sont respectivement responsables de la régulation des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse *de novo*, dans la voie de sauvetage et dans l'importation de TPP (Rodionov *et al.*, 2003).

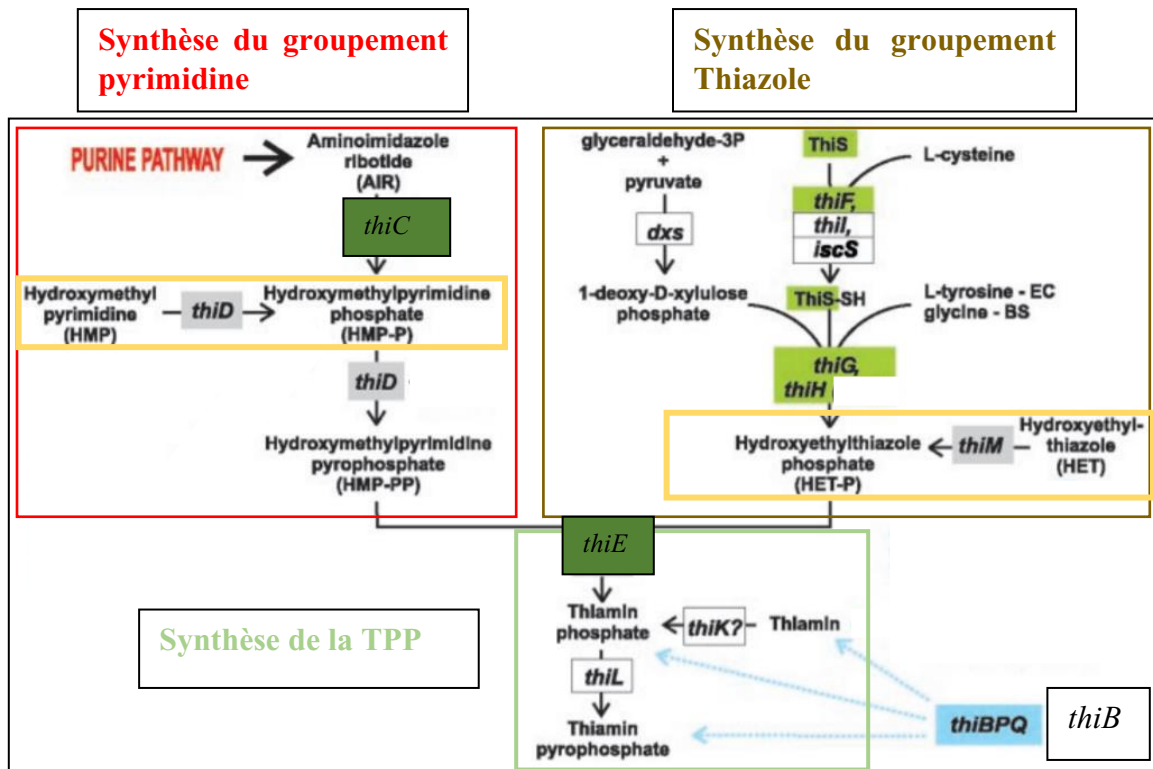


Figure 11 : La voie de biosynthèse de la thiamine chez *E. coli*. La voie de biosynthèse de *nov* comprend la synthèse des groupements pyrimidine et thiazole, la synthèse de TPP par la liaison des deux groupements pour former la thiamine phosphate et la phosphorylation de celle-ci. Cette voie est majoritairement régulée par l'opéron *thiCEFSGH* (vert). La voie de sauvetage, majoritairement régulée par l'opéron *thiMD* (gris), comprend les réactions encadrées en jaune afin de synthétiser de la TPP à partir des produits de dégradation de la thiamine présents dans la cellule ou importés à partir de l'extérieur. L'opéron *thiBPQ* (bleu) contrôle le transport de la thiamine, de la thiamine phosphate et de la TPP (Rodionov *et al.*, 2003).

1.1.3.3.1 Le riborégulateur *thiC*

Le riborégulateur *thiC* est retrouvé en amont de l'opéron *thiCEFSGH*, il encode des protéines impliquées dans la voie de biosynthèse *de novo* de la TPP. ThiC est impliqué dans la synthèse du groupement pyrimidine à partir d'un intermédiaire de la voie de biosynthèse des purines. On trouve dans la voie de synthèse du cycle thiazole ThiF, ThiS, ThiG et ThiH. Le thiazole est

synthétisé à partir du pyruvate, du D-glycéraldéhyde 3-phosphate et de la L-cystéine. Le groupement sulfure est transféré à ThiS, qui donne une protéine ThiS-SH, qui est la source de sulfure du groupement thiazole. Ensuite, ThiE couple les deux groupements pyrimidine et thiazole pour produire la thiamine phosphate qui sera finalement phosphorylée en TPP par la kinase ThiL (Rodionov *et al.*, 2003).

1.1.3.3.2 Le riborégulateur *thiM*

Le riborégulateur *thiM* est situé devant l'opéron *thiMD* (Figure 12). De nombreuses études de régulation ont été réalisées sur la structure et sur le mécanisme de régulation de *thiM* (Edwards & Ferré-D'Amaré, 2006; Serganov *et al.*, 2006; Winkler *et al.*, 2002). Ce riborégulateur contrôle l'expression de l'opéron *thiMD* qui encode deux kinases impliquées dans la voie de sauvetage de la TPP (Figure 11) afin de la synthétiser à partir de l'hydroxy méthyl pyrimidine (HMP) ou l'hydroxy méthyl thiazole (HET) qui sont deux intermédiaires de dégradation de TPP que la bactérie récupère de leur milieu de culture pour synthétiser le TPP (Bellion *et al.*, 1983).

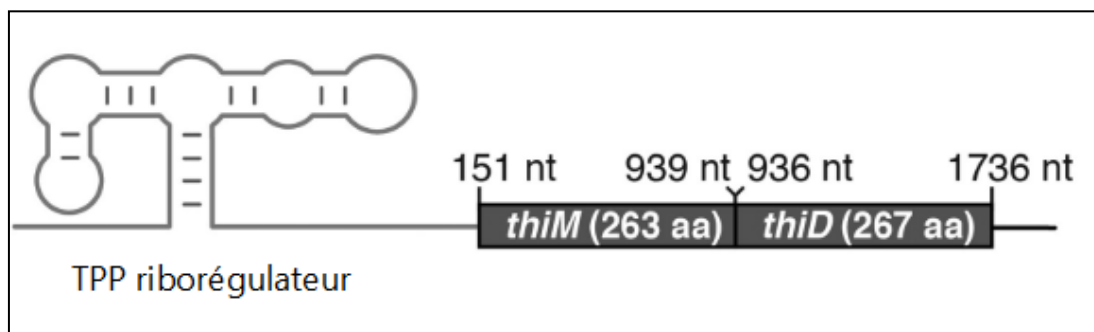


Figure 12 : Schéma représentant le riborégulateur *thiM* et l'opéron *thiMD*.

Une structure secondaire simplifiée de l'aptamère du riborégulateur *thiM* est représentée. Les emplacements génomiques et les tailles des deux protéines sont indiqués. Il y a un chevauchement de trois nucléotides entre *thiM* et *thiD* (Bastet *et al.*, 2017).

1.1.3.3.3 Le riborégulateur *thiB*

Le riborégulateur *thiB* est responsable de la régulation de l'opéron *thiBPQ*, qui encode un ABC transporteur responsable de l'importation de thiamine, de thiamine phosphate et de thiamine pyrophosphate (Figure 11) (Webb *et al.*, 1998). Les ABC transporteurs sont responsables du transport d'une grande variété d'ions et de petits métabolites dans la cellule. Ils sont composés d'une protéine périplasmique de liaison (ThiB), d'une perméase transmembranaire (ThiP) et d'une ATPase cytosolique (ThiQ) (Rodionov *et al.*, 2003).

1.1.4 Objectifs de la maîtrise

Les riborégulateurs de TPP sont des d'ARN impliqués dans la régulation de la biosynthèse et le transport du TPP qui est indispensable pour la bactérie. Les riborégulateurs régulent l'expression des gènes en modulant leur structure (Chauvier & Lafontaine, 2015), ce qui rend l'étude de leur structures natives important pour caractériser leur régulation.

Dans ce cadre, un membre du laboratoire, Adrian Chauvier a étudié la structure du riborégulateur *thiB* au niveau de la tige P1 par une technique qui cible des régions spécifiques de l'ARN avec une sonde d'ADN et une enzyme. Si cette sonde s'hybride sur l'ARN, il y a un clivage par l'enzyme. La région est alors simple brin, sinon cette région est double brin et il n'y a pas de clivage. Il a fait cette expérience sur deux structures de *thiB*, ARN transcrit jusqu'au nucléotide 83 dont la position 83 présente un site de pause et l'autre, jusqu'au 88 qui présente la position de la formation de la tige P1, avec et sans le ligand TPP.

Adrien Chauvier a remarqué qu'au niveau de la structure de *thiB* 83, le riborégulateur possède une efficacité faible pour détecter le ligand TPP. Cependant, le riborégulateur peut très bien lier le ligand quand il est transcrit à la position 88 donc la limite pour la meilleure détection co-transcriptionnelle de TPP est contenue dans la fenêtre de 5nt entre EC-83 et EC-88. Les cinq nucléotides de différence nous suscitent des questionnements à l'égard de la différence entre ces

deux constructions au niveau de leur structure. Ces résultats sont présentés sous forme d'article et sont en processus de soumission dans un journal scientifique.

Au regard de ces constats, nos objectifs à propos du riborégulateur *thiB* sont :

- Étudier la structure de *thiB* pour les constructions 83 et 88 afin de comprendre le phénomène de liaison du ligand.
- Étudier l'affinité de *thiB* vis-à-vis de son ligand au niveau des transcrits 83 et 88.

Nous nous intéressons aussi à l'étude de la structure du riborégulateur *thiM* dû a son importance dans la biosynthèse du TPP. Dans ce cadre, nous allons étudier la structure de *thiM* au niveau des pauses pour voir leur influence sur le repliement du riborégulateur afin de faire le lien avec la fonction régulatrice de l'ARN. Ensuite, nous allons créer un modèle général de repliement co-transcriptionnel de *thiM*.

CHAPITRE 2

ÉTUDE STRUCTURALE DU RIBORÉGULATEUR *thiB*

2.1. Introduction

En 2002, une étude comparative de génome a permis de prédire la structure du riborégulateur *thiB* à la suite d'alignements faits par bio-informatique (Figure 13) (Rodionov *et al.*, 2003).

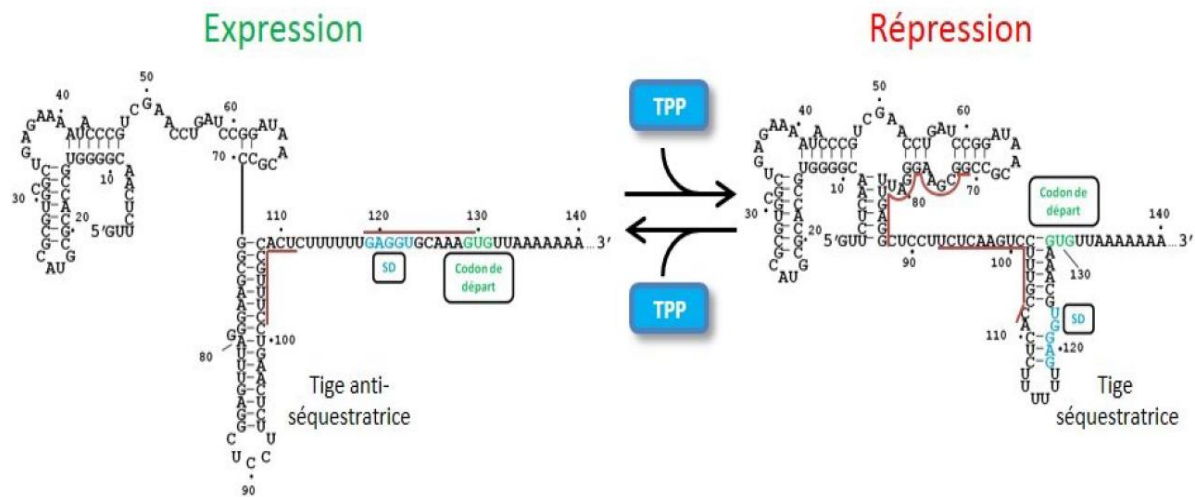


Figure 13 : Structure prédite du riborégulateur *thiB*. En absence de TPP, l'opéron *thiBPQ* est exprimé, donc il y a formation d'une tige anti-séquestratrice qui rend la séquence SD (bleu) et le codon de départ GUG (vert) accessibles. En présence de TPP, il y a répression de l'expression. La formation de la tige P1 à la suite de la liaison du ligand empêche la formation de la tige anti-séquestratrice. Cette dernière se forme et empêche la liaison du ribosome au SLR et au codon d'initiation. La ligne rouge représente les appariements retrouvés dans la structure alternative (Rodionov *et al.*, 2003).

La structure du riborégulateur *thiB* est étudiée par trois techniques : SHAPE, DMS et RNase H. Les deux premières techniques se basent sur l'utilisation d'un réactif chimique tandis que la troisième utilise l'enzyme RNase H.

2.2. Matériels et méthodes

2.2.1. Transcription *in vitro*

Les structures étudiées sont des ARN en complexe d'élongation. Autrement dit, on utilise des ADN qui possèdent à leur extrémité 3' de la biotine. La biotine sert à créer un complexe avec la streptavidine au moment de la transcription, qui va bloquer l'ARN polymérase à la position désirée. Les matrices d'ADN utilisées pour effectuer la transcription *in vitro* ont été préparées par une réaction de polymérisation en chaîne avec les couples d'amorces décrites dans les Tableaux 3 et 4 (Annexe). Les transcriptions *in vitro* ont été réalisées sur deux étapes. La première est d'obtenir un complexe d'élongation stable (EC) de 12 nucléotides est formé par l'incubation de l'ADN, la polymérase, le facteur sigma, la streptavidine, le trinuécléotide initiateur et les trois nucléotides nécessaires. La transcription a été complétée par l'addition des quatre nucléotides.

2.2.2. Précipitation avec phénol-chloroforme-isoamyl (PCI)

La précipitation avec le phénol-chloroforme-isoamyl se fait après la transcription *in vitro*. On ajoute de PCI après on centrifuge et on prélève 80 à 90 % de la phase aqueuse et on précipite avec l'éthanol.

Une fois le PCI ajouté, les ARN ont été précipités dans une solution composée de 100 % d'éthanol, d'acétate d'ammonium et de glycogène. Une fois cette étape réalisée, on centrifuge, on enlève le surnageant et on obtient les culots qu'on lave avec de l'éthanol. Les culots ont ensuite été brièvement séchés et suspendus de nouveau dans l'eau.

2.2.3. Précipitation avec le trizol.

La précipitation avec le trizol consiste à ajouter le trizol à l'ARN transcrit. Puis, ajouter de chloroforme et centrifuger. Enfin, prélever le surnageant et passer à la précipitation avec l'éthanol (voir section 2.2.2. Précipitation avec PCI).

2.2.4. Précipitation avec le Kit GeneJet.

Le kit contient trois tampons à utiliser, des colonnes avec des tubes collecteurs et le protocole à suivre.

2.2.5. SHAPE

La technique SHAPE : *Selective 2'-Hydroxyl Acylation analyzed by Primer Extension* interroge la flexibilité du squelette local dans l'ARN. En effet, les nucléotides d'ARN flexibles, c'est-à-dire ceux qui ne sont pas appariés avec d'autres nucléotides, sont très réactifs envers le N-méthyle isatoïque anhydride (NMIA). Les sites modifiés sont détectés comme des arrêts dans une réaction d'extension d'amorces, suivie par une électrophorèse (Figure 14) (Merino et al., 2005). Des données de réactivité quantitative SHAPE sont utilisées pour établir la structure secondaire d'un ARN (Wilkinson *et al.*, 2006). Autrement dit, une quantification des bandes du réactif NMIA ainsi que sa solution de contrôle, qui est le diméthylsulfoxyde (DMSO), est établie. Un rapport avec les valeurs est généré par le logiciel Quantity One. On soustrait la valeur du DMSO à la valeur du NMIA puisque le DMSO est notre solution de contrôle et le NMIA est dissout dans du DMSO puis on ajuste les valeurs négatives à zéro. On fait ensuite la moyenne des 10 % des valeurs les plus réactives et cette valeur sera la valeur de la référence. On divise nos valeurs sur la valeur de référence et on crée un profil de réactivité du SHAPE sous forme d'un histogramme. Finalement, pour déterminer la structure, on utilise un serveur web de détermination de structure d'ARN (rna.rochestee.edu) et on entre la séquence de nucléotide et le profil de réactivité SHAPE.

Les complexes natifs d'élongation de la transcription ont été obtenus comme indiqué dans la section 2.2.1. Les ARN ont par la suite été incubés avec du DMSO ou de NMIA. Les transcrits modifiés ont été incubés avec une amorce d'ADN radiomarquée (Tableau 1 annexe). Les réactions de transcription inverse ont été réalisées avec l'enzyme de Superscript III (ThermoFisher) et les produits ont été séparés sur gel d'électrophorèse dénaturant (acrylamide : bisacrylamide 19:1, TBE 1X et 8 M urée).

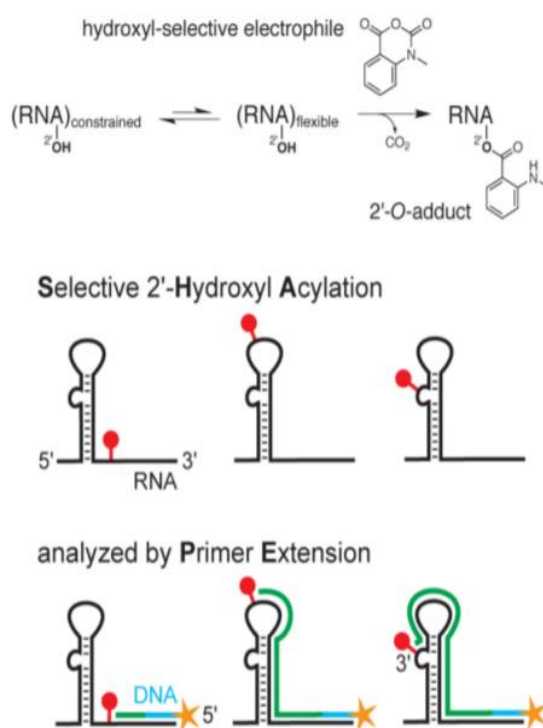


Figure 14 : Principe du SHAPE. La figure montre en premier lieu la réaction chimique qui se produit par l'ajout du réactif NMIA et, par la suite, la transcription reverse effectuée par l'amorce marquée radioactivement (Weeks & Kevin, 2011).

2.2.6. DMS

Le DMS (Diméthylesulfate) est une sonde chimique qui permet de cartographier l'adénine et la cytosine qui ne sont pas appariées à des bases complémentaires (Ding *et al.*, 2015). Le DMS peut être utilisé *in vivo* ou *in vitro*.

L'expérience avec le DMS est faite de la même façon que NMIA. L'ARN est traité avec une faible concentration de DMS (10 mM) pendant 15 minutes à température pièce. L'ARN méthylé est ensuite déprotéiné et isolé (précipitation). Une réaction de transcription inverse est effectuée pour détecter les sites de modifications et après, on ajoute le NaOH 4M et on procède à l'incubation à 95 degrés pendant 3 minutes pour détruire l'ARN tout en laissant intact l'ADNc nouvellement formé. Les positions de modification sont déterminées par PAGE dénaturante.

Le DMS possède une réaction rapide, permettant une résolution temporelle élevée. Par rapport aux sondes enzymatiques (les nucléases), la petite taille du DMS permet une haute résolution spatiale.

2.2.7. Transcription des échelles de séquençage à l'aide de didésoxyribonucléotide.

On tente d'obtenir des arrêts de transcriptions inverse à tous les nucléotides afin de s'en servir comme échelle de séquençage. Pour ce faire, on utilise des didésoxyribonucléotides ddNTP dont les groupements 2'OH et 3'OH du ribose sont absents (Figure 15). L'ARN a été transcrit tel que décrit précédemment. On prépare quatre tubes contenant chacun 1 µl de l'ARN à 1 pmol, 1 µl du tampon TE1X et soit 2 µl de ddNTP (ddT et ddA), soit 3 µl de ddNTP pour ddG et ddC de concentration 10 µM et on ajuste le volume à 10 µl avec de l'eau, puis on procède à la transcription inverse, comme indiqué à la section du SHAPE.

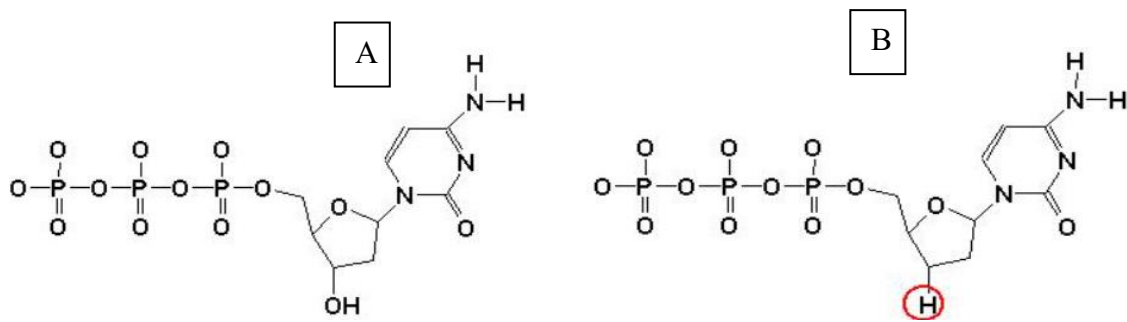


Figure 15 : Représentation de dCTP (A) et ddCTP (B). Dans la figure 15, on peut voir l'absence d'un groupement 3'OH du ribose (cercle rouge). L'incorporation de ce nucléotide cause l'arrêt de transcription.

2.2.8. La RNase H

La ribonucléase H est une endonucléase non spécifique bien connue qui clive les hydrides ADN/ARN via un mécanisme hydrolytique (Winkler *et al.*, 2002). Dans cet essai, une sonde d'ADN de 10 nucléotides (Tableau 2 Annexe) est utilisée pour sonder l'accessibilité relative d'une région dans une molécule d'ARN donnée. Alors qu'une région simple brin peut être ciblée par le clivage de la RNase H, une région à double brin ou hautement structurée ne permet pas la liaison à l'ADN et elle est donc protégée du clivage de la RNase (Figure 15) (Chauvier & Lafontaine, 2015).

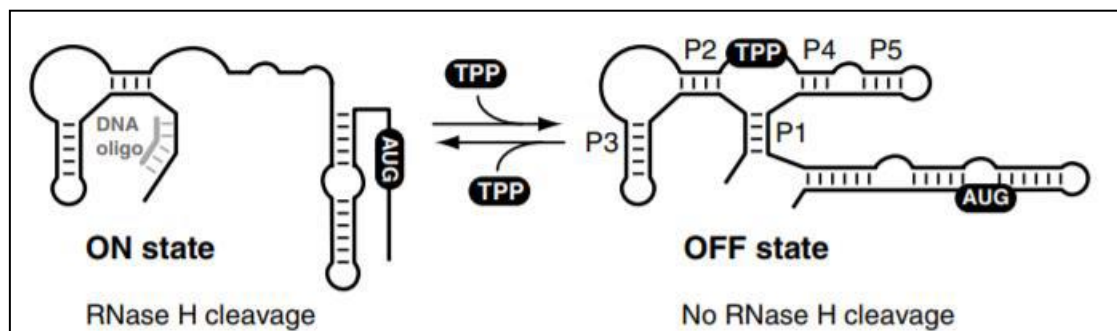


Figure 16 : Représentation schématique du riborégulateur thiM d'*E. coli*. Dans ce modèle, l'état ON (la structure du riborégulateur en absence de ligand) est adopté en l'absence de TPP et permet la traduction du ribosome grâce à l'accessibilité relative du codon de départ AUG. Cependant, en présence de TPP, le riborégulateur est réorganisé et séquestre le codon de départ

AUG, conduisant à la répression de la traduction. Les domaines hélicoïdaux P1 à P5 sont indiqués sur le riborégulateur. Selon ce modèle, un oligonucléotide d'ADN ciblant la tige P1 ne serait capable de s'hybrider qu'en l'absence de TPP (Chauvier & Lafontaine, 2015).

Afin de réaliser un essai de cartographie à la RNase H, une matrice d'ARN est réalisée préalablement telle que décrite dans la section transcription *in vitro*. Des transcrits en présence et en absence de ligand sont produits. L'ARN est incubé avec une sonde d'ADN et l'enzyme RNase H. Plusieurs sondes sont utilisées. Les réactions sont migrées sur un gel d'acrylamide dénaturant.

Détermination du K_{switch} .

Le K_{switch} est la concentration de ligand nécessaire pour faire basculer un riborégulateur d'un état vers un autre (actif vers inactif ou vice versa). Cette valeur est déterminée avec la technique de la cartographie à la RNase H avec quelques modifications. D'abord, 20 réactions sont transcrites avec une concentration de ligand croissante. Les valeurs utilisées pour le riborégulateur *thiB* varient entre 0 et 2,5 mM. Une fois les transcriptions terminées, les réactions sont incubées avec la sonde d'ADN 2478 AC (Tableau 2 Annexe), puis avec la RNase H, comme mentionné précédemment. Les réactions sont déposées sur un gel d'acrylamide pour visualiser le clivage. Le pourcentage de clivage est quantifié grâce au logiciel Quantity One, on divise la valeur du bande de clivage sur la somme du valeur du clivage et de la valeur de la pleine longueur. Le pourcentage de clivage par rapport à la concentration de ligand est modélisé, puis le logiciel (GraphPad prism) calcule la concentration à laquelle 50 % de la population change de conformation, ce qui correspond au K_{switch} .

2.3. Résultats

2.3.1. SHAPE et DMS

La technique de SHAPE natif permet de connaître la structure réelle du riborégulateur. L'étude se fait sur des complexes d'élongation. Dans le cas de ce projet, on a focalisé sur deux complexes : les complexes d'élongation 83 et 88. Les deux structures n'ont pas la même affinité pour le ligand TPP. La structure EC-83 (ON state) est incapable de lier le ligand alors que la structure EC-88 (OFF state) en est capable. Les résultats obtenus n'ont pas été suffisants pour les quantifier et déterminer la structure (Figure 17). Pendant une année, on a fait l'expérience de SHAPE pour les deux complexes, mais les gels obtenus ne sont pas fiables. Par conséquent, on ne peut pas différencier les nucléotides pour avoir la séquence complète et prédire la structure. On a essayé d'optimiser la technique, dans un premier lieu, en changeant la concentration des réactifs NMIA et DMS. On a ainsi créé un gradient de différentes concentrations.

Les résultats ne se sont pas améliorés: soit le réactif réagit avec la majorité de l'ARN, soit il réagit avec peu de nucléotides. Dans un deuxième lieu, on a ciblé la purification de l'ARN après avoir réagit avec le réactif. Trois techniques ont été utilisées :

- 1- La précipitation par le phénol-chloroforme-isoamyl;
- 2- la précipitation par le trizol;
- 3- la précipitation avec un kit commercial GenJet de ThermoFisher.

Le kit a donné de meilleurs résultats au niveau de la purification, mais n'a pas donné des bandes séparées et claires. Finalement, on a joué sur les trois conditions suivantes au niveau de la réaction :

- 1- Modification de l'amorce marquée radioactivement (Tableau 2 Annexe);
- 2- changement de la température de la réaction;
- 3- présence ou non de la précipitation.

Les résultats ne se sont pas encore améliorés. En effet, avant d'appliquer la technique SHAPE sur nos deux structures de thiB, on a fait l'expérience sur un ARN de contrôle positif : Minimind 1. C'est une petite séquence de l'ARN long non codant Tunar sur lequel mon collègue Jean Christophe Dancause effectue ces recherches sur sa structure et dont la technique de SHAPE nous a permis d'avoir sa séquence complète. Dans notre cas, nous avons appliqué la technique sur des ARN natifs pour voir la structure en temps réel. La différence de l'état de l'ARN entre natif et déjà transcrit complique la réaction de SHAPE. Autrement dit, le réactif de SHAPE réagit plus facilement avec l'ARN déjà transcrit, tandis que c'est plus difficile d'accéder aux régions de l'ARN en complexe d'élongation et dans son état natif. Par conséquent, on a changé de technique.

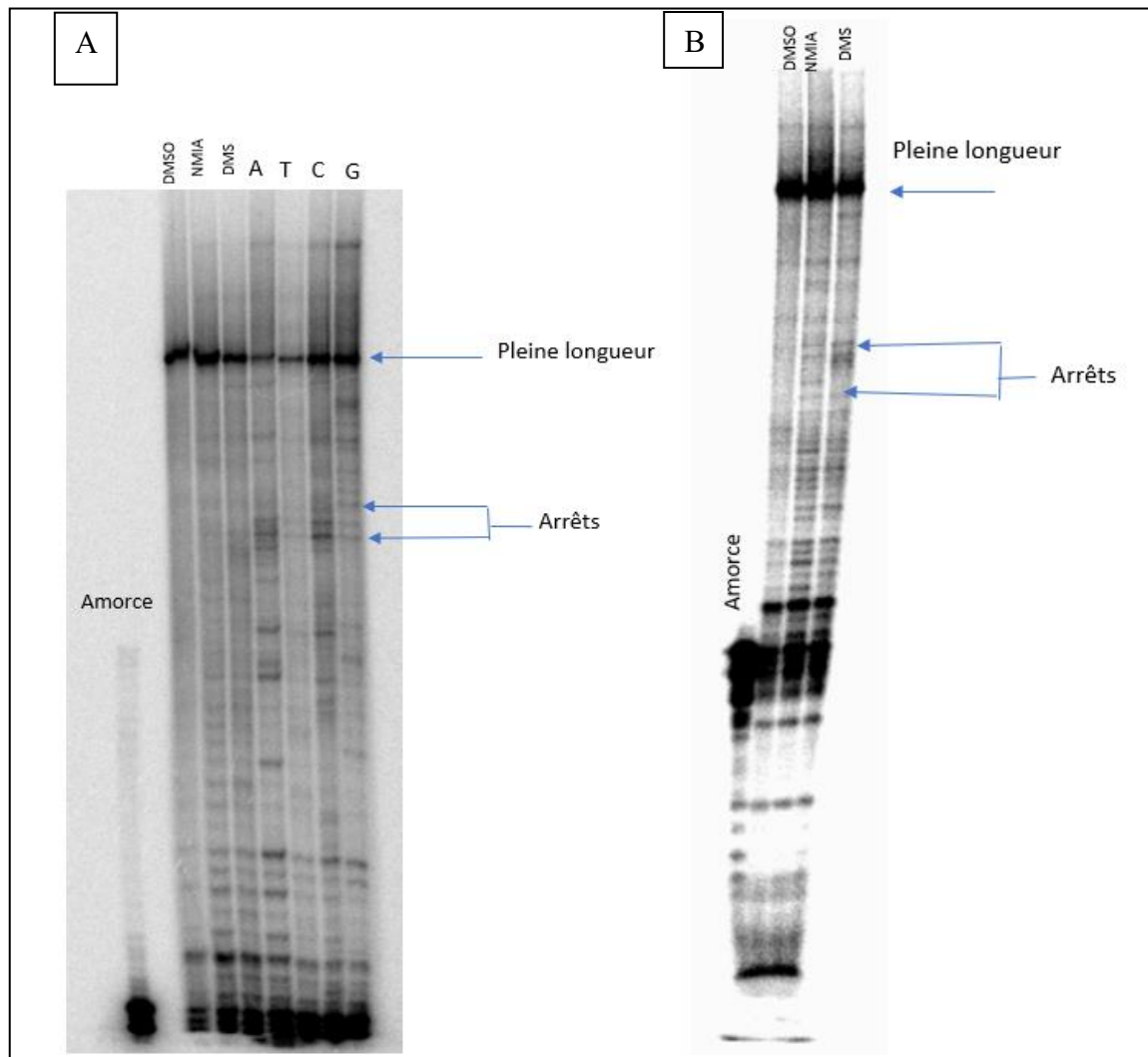


Figure 17 : Résultat d'un gel de *SHAPE* natif. A) Résultat de *SHAPE* natif sur complexe d'elongation 88 en utilisant deux réactifs différents avec échelle pour séquençage. B) Résultat du *SHAPE* natif sur complexe d'elongation 83. A, T, C et G représentent l'échelle de séquençage.

2.3.2. RNase H

La cartographie à l'aide de la RNase H permet de cibler des zones au niveau de l'ARN qui changent de structure lors de la liaison du ligand. Une fois les régions intéressantes déterminées, plusieurs sondes de 10 nucléotides, en se décalant de 1 nucléotide en 3' à chaque fois, ont été

testées. Dans le cas de *thiB*, on observe un fort pourcentage de clivage de l'ARN en absence du ligand et un faible clivage lorsque le riborégulateur est lié au ligand. Dans cette partie, on montrera seulement les résultats qui ont donné une différence remarquable de clivage avec et sans ligand. On peut voir, par exemple, sur la figure 17A, les endroits ciblés par les différentes sondes. Les résultats obtenus par RNase H confirment la structure prédite, au moins dans les zones ciblées par les sondes. Les pourcentages de clivage de *thiB* EC-88 et EC-83 avec les sondes 41 et 63 sont différents. En effet, pour EC-88 avec ligand et la sonde 41, on a 26 % de clivage (Figure 18) et sans ligand c'est 62 % alors que pour EC-83, on a 40 % de clivage (Figure 20) et 71 % sans ligand. La sonde 63 pour EC-88 on a 97 % sans ligand et 70% avec ligand (Figure 19) tandis que EC-83 on a 58 % sans ligand et 38 % avec ligand. Le tableau qui suit résume les valeurs les plus importantes obtenues par la RNase H.

Tableau 2: les pourcentages de clivage obtenues par les sondes 41 et 63 pour *thiB* EC-83 et EC-88

Construction de <i>thiB</i> utilisée	% clivage avec la sonde 41 sans ligand	% clivage avec la sonde 41 avec ligand	% clivage avec la sonde 63 sans ligand	% clivage avec la sonde 63 avec ligand
EC-83	71	40	58	38
EC-88	62	26	97	70

En présence du ligand, si le clivage est faible cela montre qu'il y a une grande protection dans cette zone dû à l'appariement des nucléotides. En contrepartie, si même en présence ou en absence de ligand le clivage est élevé cela montre que c'est une région simple brin et il n'y a pas un grand changement de structure, lié à la présence ou à l'absence de son ligand. En se basant sur la structure prédite établie par notre laboratoire, les résultats obtenus par RNase H confirment en grande partie cette structure. En effet, le pourcentage de clivage élevé concorde avec les régions simple brin de la structure d'ARN prédite.

La technique du K_{switch} , décrite dans la partie qui suit, est utilisée pour confirmer les résultats de RNase H.

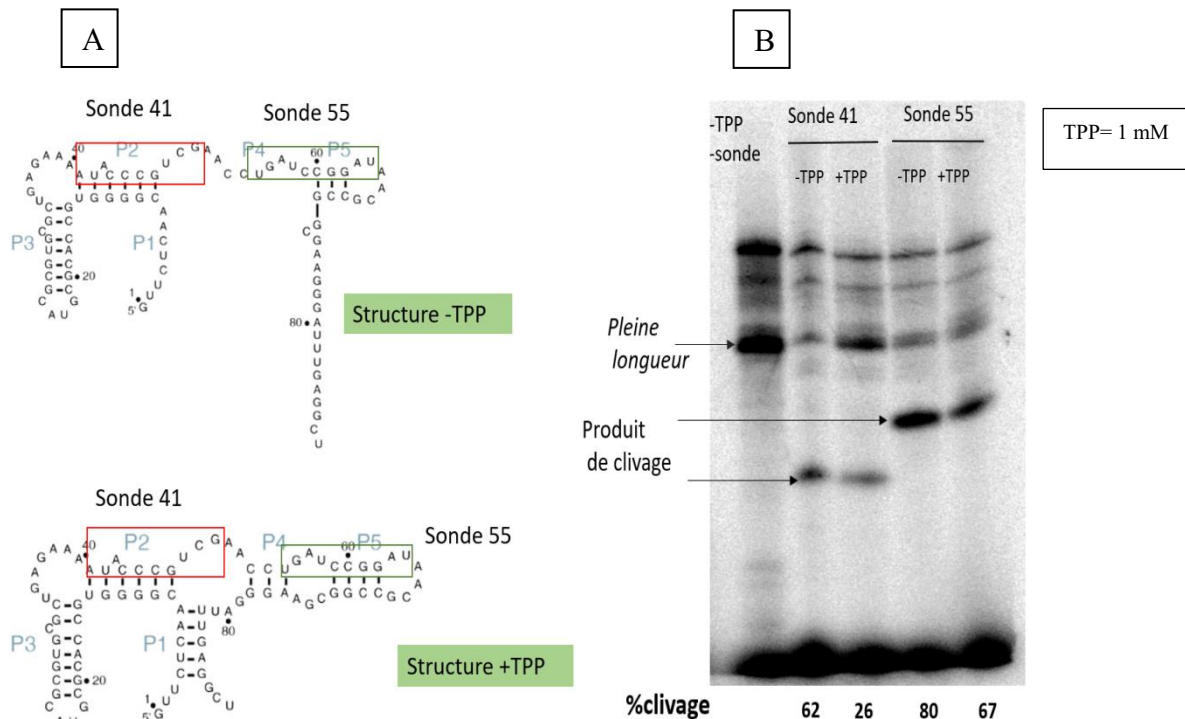


Figure 18 : Résultat de RNase H pour thiB-EC-88 avec les sondes 41 et 55.

A) Structure du riborégulateur sans et avec TPP et les positions des sondes. B) Résultats de clivage de RNase H. En absence de ligand (-TPP), le riborégulateur *thiB* permet l'hybridation de la sonde d'ADN. Par conséquent, la RNase H peut cliver l'ARN dans la région d'hybridation de la sonde. Les bandes indiquant absence de ligand présentent plus de clivage (-L 41=62 % et -L 55=80 %). En présence d'un ligand, les bandes indiquant + L 41 et + L55 présentent moins de clivage (26 % et 67 %) que sans le ligand.

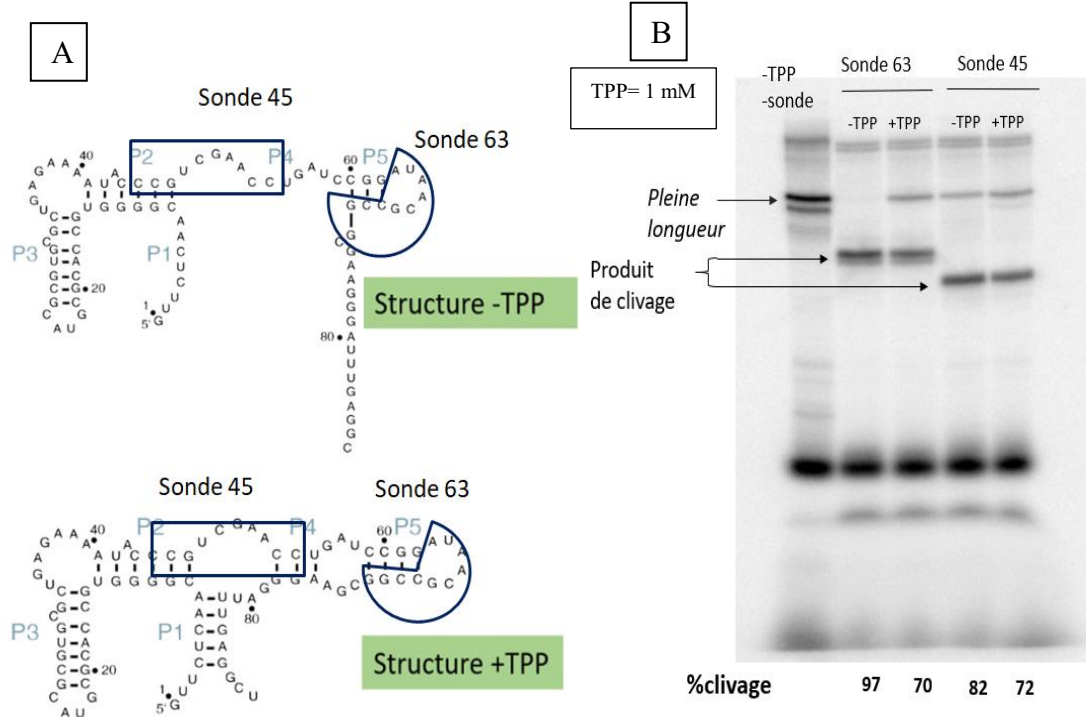
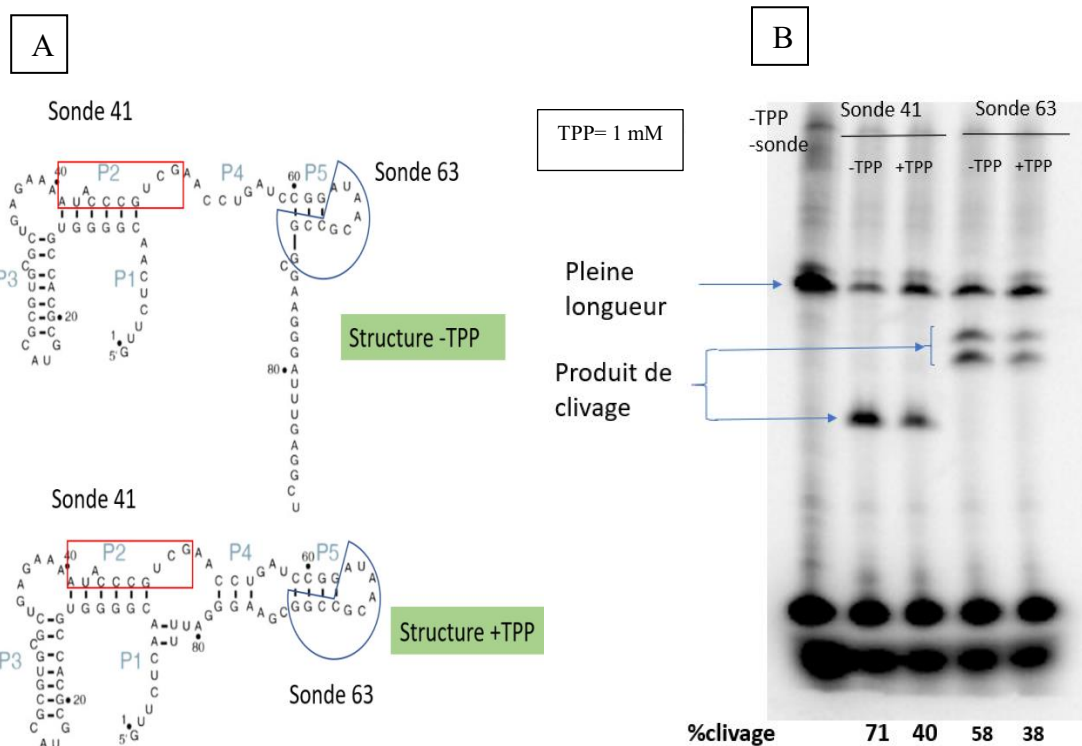


Figure 19 : Résultat de RNase H pour thiB-EC88 avec les sondes 45 et 63.

A) Structure du riborégulateur sans et avec TPP et les positions des sondes. B) Résultats de clivage de RNase H. En absence de ligand (L), le riborégulateur *thiB* permet l'hybridation de la sonde d'ADN. Par conséquent, la RNase H peut cliver l'ARN dans la région d'hybridation de la sonde. Les bandes indiquant -L 63 et -L 45 montrent plus de produits de clivage, soit 97 % et 82 % respectivement. En présence d'un ligand, les bandes indiquant + L 41 et + L55 présentent moins de clivage que sans le ligand.



- K_{switch}

Depuis quelques années, une technique a été développée dans le laboratoire Lafontaine qui permet de quantifier la concentration de ligand conduisant au changement de conformation de l'ARN et, plus spécifiquement, les riborégulateurs. Cette mesure est nommée le K_{switch} . Il ne faut pas confondre le K_{switch} avec le K_D (constante de dissociation). Le K_D est obtenu lorsque l'ajout du TPP est fait après la transcription alors que pour le k_{switch} , le TPP est ajouté au moment

de la transcription. Le K_{switch} présente 50 % des riborégulateurs qui passent d'une conformation à une autre, c'est-à-dire de ON à OFF ou de OFF à ON.

On peut voir sur la figure 20A l'endroit ciblé par la sonde. Le choix des sondes a été fait selon le résultat obtenu par RNase H. La sonde 41 a donné un grand écart de clivage entre les valeurs sans et avec TPP (sans ligand 71 % et avec ligand 40 %) . Une fois le gel obtenu, on rapporte chaque piste en pourcentage de clivage par rapport à la concentration du ligand présent lors de la transcription. On modélise les données dans le logiciel GraphPad Prism. Pour la construction du *thiB* EC-83, on obtient une valeur de K_{switch} de 14 μM (Figure 20). Cette valeur montre que le *thiB* EC-83 possède une très faible efficacité pour effectuer la détection du ligand, c'est pour cela il faut avoir une concentration élevée de TPP afin de passer d'une conformation à une autre. Malheureusement, par manque de temps, on n'a pas pu faire la même expérience pour la structure de *thiB* EC-88 pour voir la différence entre les deux K_{switch} , mais on s'attend à avoir un K_{switch} élevé pour EC-88. Lorsqu'on s'attarde aux valeurs de RNase H, l'affinité du riborégulateur pour le TPP est plus faible en EC-83 qu'en EC-88. Ces résultats nous mènent à penser que l'affinité faible en EC-83 est due à la partie P1 de l'aptamère qui n'est pas complètement formée, ce qui rend le riborégulateur moins stable.

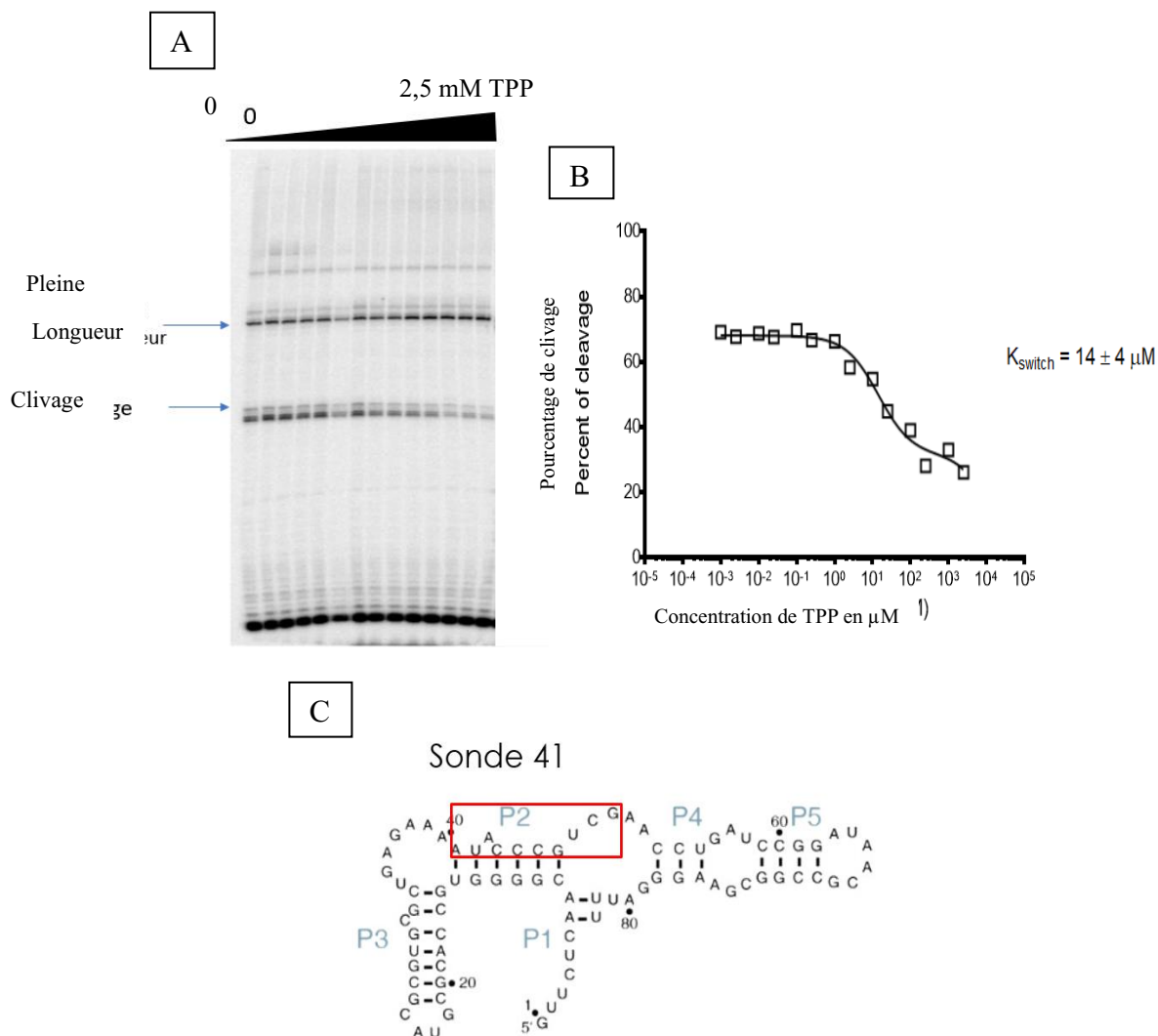


Figure 21 : Détermination du K_{switch} . A) Résultat du gel obtenu pour le K_{switch} en présence de 0 à 2,5 mM de TPP et de la sonde 41. B) Modélisation des pourcentages de clivage en fonction de la concentration de TPP lors de la transcription. C) Structure prédite de *thiB* EC-83 avec la sonde 41 qui est encadrée en rouge.

CHAPITRE 3

ÉTUDE DE L’AFFINITÉ DE *thiB* VIS-À-VIS DE SON LIGAND

3.1. Introduction

Dans cette partie, on s’intéresse à la région de l’ARN qui se situe entre 83 et 88. La différence de la valeur de RNase H observée dans cette région, spécifiquement entre la construction d’ARN 83 et ARN 88, nous mène à penser que chaque structure entre ces deux constructions sont différentes d’où le changement de l’affinité à son ligand. En d’autres termes, la valeur de K_D en 83 est plus élevée que 88. Pour cette raison, on va utiliser la technique de cartographie en ligne au magnésium.

3.2. Matériels et méthodes

L’ARN est une molécule non stable en solution qui a naturellement tendance à se dégrader sans l’intervention d’une réaction enzymatique. Cette dégradation s’opère différemment selon la structure de l’ARN. L’ARN double-brin est plus stable dans sa conformation et risque moins d’adopter une conformation en ligne que l’ARN simple-brin. La cartographie chimique au magnésium utilise le clivage spontané de liaisons inter nucléotidiques spécifiques d’une molécule d’ARN d’une manière indépendante de la séquence, ce qui permet d’étudier la structure secondaire et les changements de conformation de la molécule d’ARN. La présence du magnésium est indispensable pour cette réaction. Ce clivage spontané se produit via une réaction de transestérification intramoléculaire résultant d’une attaque nucléophile par l’oxygène en 2' du ribonucléotide sur le phosphore adjacent. Les produits de clivage en 5' et 3' résultants contiennent respectivement des phosphates 2', 3'-cycliques ou 5'-hydroxyles terminaux. Une orientation « en ligne », dans laquelle le groupe partant est placé derrière le centre du phosphore, à près de 180 ° par rapport au nucléophile, est nécessaire pour que la réaction se déroule (Figure 22). Les nucléotides engagés dans la structure secondaire, tels que

ceux dans une hélice de forme A, ne peuvent pas adopter une orientation en ligne et sont donc moins susceptibles de se cliver. Inversement, les régions simple brin présentent plus de flexibilité, ce qui permet aux nucléotides non appariés de se cliver (Nahvi & Green, 2013).

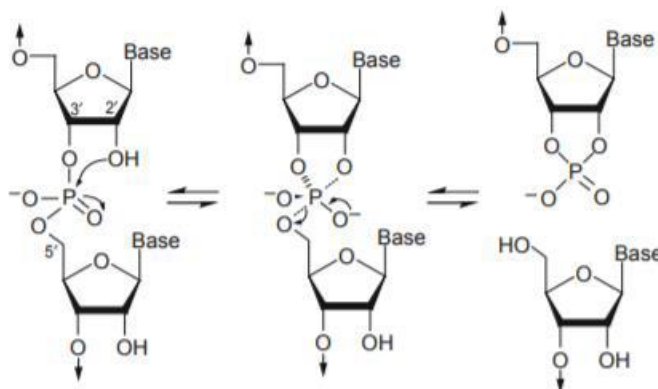


Figure 22 : Schéma qui illustre le principe de la cartographie en ligne. L'attaque nucléophile « en-ligne » est nécessaire pour un clivage efficace d'un lien phosphodiester. Quand l'oxygène en 2' adopte un arrangement linéaire avec le phosphore et l'oxygène en 5', l'oxygène en 2' produit une attaque nucléophile sur le phosphate adjacent, clivant ainsi le lien entre les deux nucléotides (Nahvi & Green, 2013).

L'expérience est réalisée comme suit : les ARN radiomarqués en 5' (Tableau 3 Annexe) ont été incubés avec du $MgCl_2$ et d'autres tampons pendant 48 heures à température ambiante. Les réactions ont été arrêtées par l'ajout de formamide. Les produits de réaction ont ensuite été séparés lors d'une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes et révélés par autoradiographie.

3.3. Résultats

La technique de la cartographie en ligne au magnésium a été utilisée pour déterminer si le riborégulateur *thiB* est capable de lier la TPP ou pas. Cette technique a permis d'observer les changements structuraux dans le riborégulateur *thiB* lorsqu'il est incubé en présence de concentration croissante de TPP. Ces changements sont, la plupart du temps, des diminutions de clivage (nucléotide protégé). En déterminant le taux de clivage spontané de l'ARN à une

position affectée par la présence de TPP par rapport à une position ne semblant pas être affectée, il a été possible de déterminer la constante de dissociation (K_D). Les K_D ont été déterminés par cartographie chimique au magnésium.

Dans le cadre de ce projet, on a étudié les tronqués d'ARN du riborégulateur *thiB* et on a ciblé la région entre 83 et 88. Contrairement au complexe d'élongation, les tronqués sont des ARN transcrits qui sont détachés de l'ARN polymérase et de l'ADN après leurs transcriptions. Plusieurs transcriptions d'ARN ont été faites pour les constructions suivantes : tr83, tr84, tr85, tr86, tr87 et tr88. Seulement les tr84, tr86 et tr87 ont donné de beaux transcrits (Figure 23). Pour cette raison, on a réussi à faire seulement l'expérience de la cartographie en ligne (K_D) pour tr84, tr86 et tr87 (Figures 24, 25 et 26).

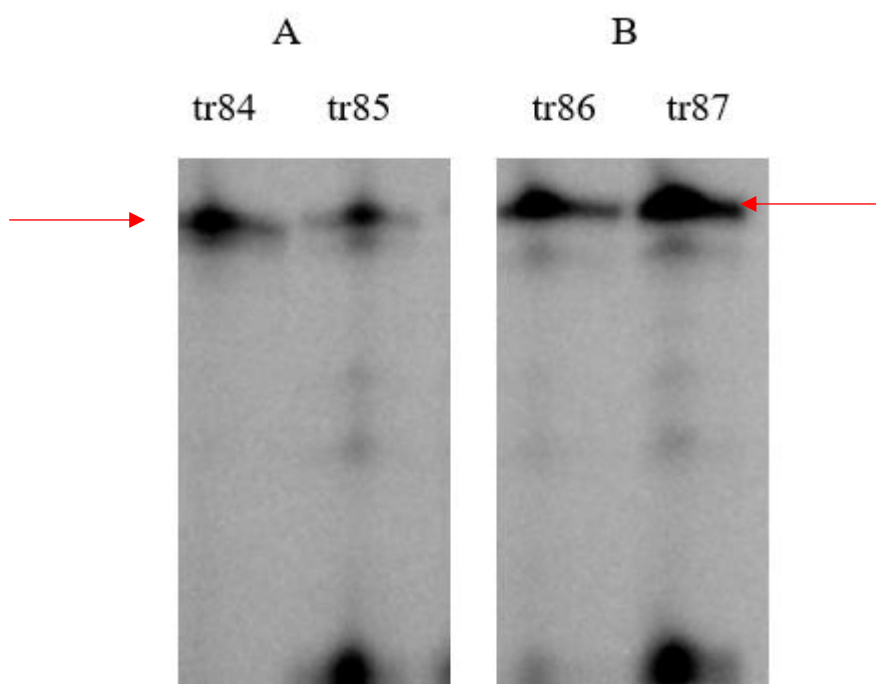


Figure 23 : Transcription des tronqués 84, 85, 86 et 87. La transcription est réussite pour les tronqués 84, 85, 86 et 87 puisque le signal de l'ARN pleine longueur est intense (flèches rouge).

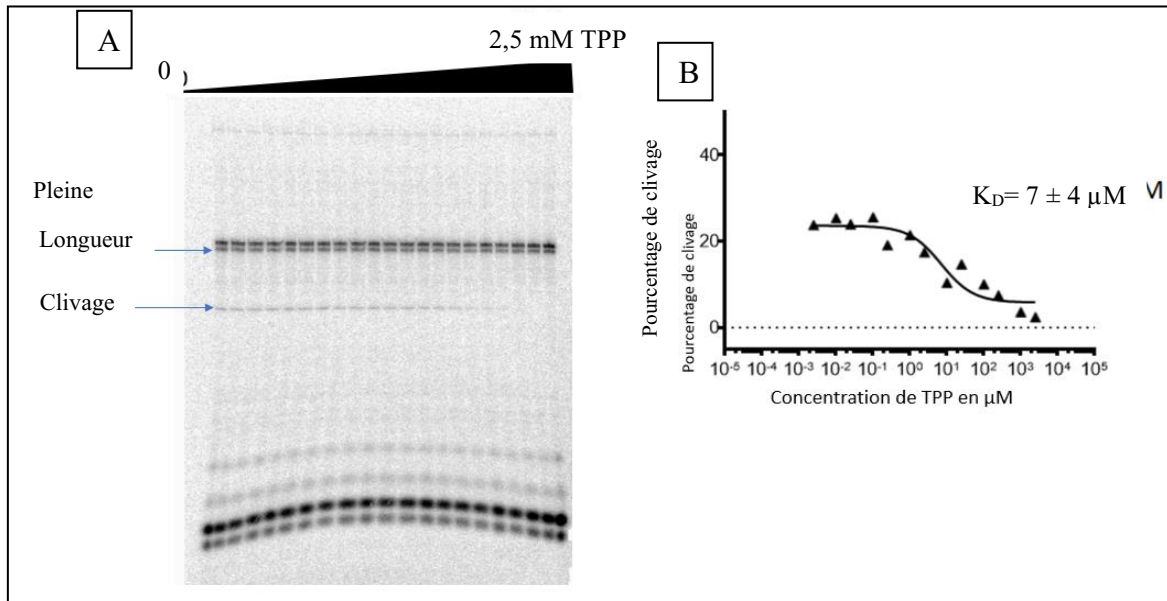


Figure 24 : Détermination de K_D pour la construction du tr84. A) Résultat du gel obtenu par la cartographie en ligne en présence de 0 à 2,5 mM de TPP. B) Modélisation des pourcentages de clivage en fonction de la concentration de TPP lors de la transcription.

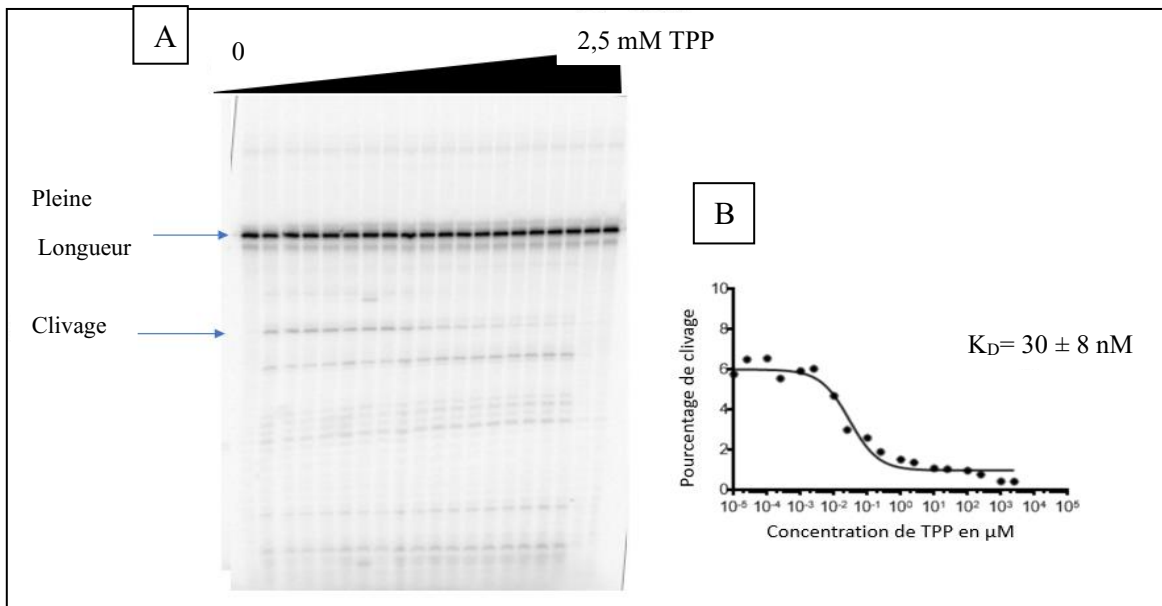


Figure 25 : Détermination de K_D pour la construction du tr86. A) Résultat du gel obtenu par la cartographie en ligne en présence de 0 à 2,5 mM de TPP. B) Modélisation des pourcentages de clivage en fonction de la concentration de TPP lors de la transcription.

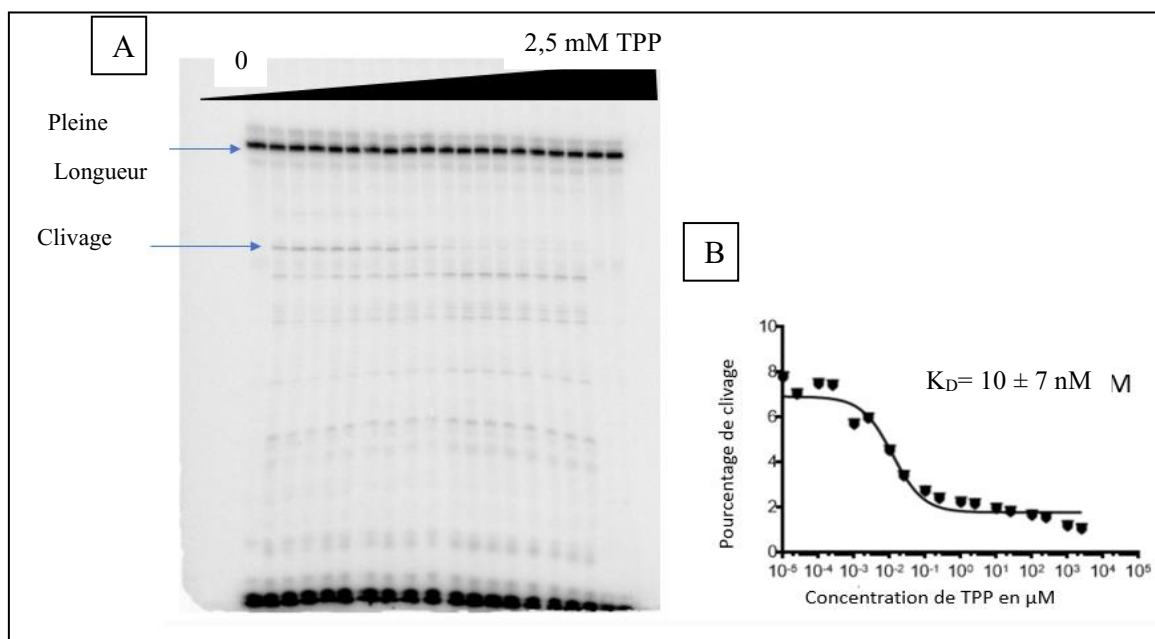


Figure 26 : Détermination de K_D pour la construction du tr87. A) La cartographie en ligne en présence de 0 à 2,5mM de TPP. B) Modélisation des pourcentages de clivage en fonction de la concentration de TPP lors de la transcription.

Les valeurs obtenues de K_D sont résumées dans le tableau3 :

Tableau 3: Les valeurs de K_D pour chaque construction tronquée de *thiB*

Construction de <i>thiB</i> utilisée	Valeur de K_D
84	7000 nM ± 4000 nM
86	30 nM ± 8 nM
87	10 nM ± 7 nM

Les valeurs de K_D obtenues montrent que l'affinité de *thiB* au niveau de tr87 est beaucoup plus élevée que celle de tr84. On peut expliquer ce résultat par le fait qu'au niveau de 87, la tige P1 de l'aptamère est formée, donc notre riborégulateur est plus stable et plus efficace au niveau de

la liaison du ligand. Ces résultats obtenus pour les tronqués concordent avec les complexes d'élongation. Mon collègue Jean-François Nadon, a étudié l'affinité du riborégulateur *thiB* au niveau des complexes d'élongation. Les valeurs obtenues pour les EC-84 à EC-88 montrent que la constante de dissociation K_D est plus faible en allant d'EC-84 à EC-88 (Figure 27).

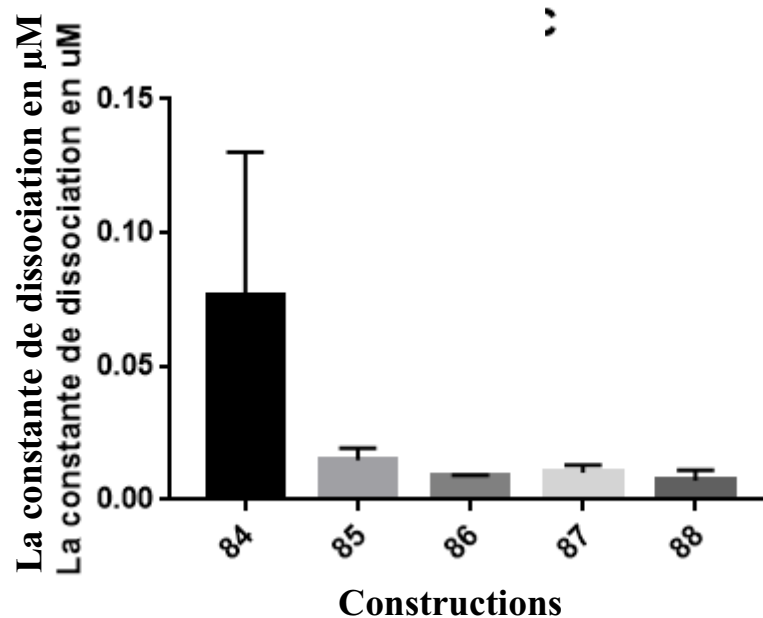


Figure 27 : Les valeurs de K_D pour les complexes d'élongation de *thiB*. Il y a une différence d'affinité au ligand pour chaque construction de *thiB*.

CHAPITRE 4

ÉTUDE STRUCTURALE DU RIBORÉGULATEUR *thiM*

4.1. Introduction

Dans cette partie, on s'intéresse à l'étude de la structure de *thiM* au niveau des pauses transcriptionnelles (Figure 28). En effet, le riborégulateur *thiM* a été étudié dans notre laboratoire par Laurène Bastet, dû à son importance dans la voie de synthèse du TPP (Bastet et al., 2017). Néanmoins, on a peu d'information sur le repliement de l'ARN donc peu d'information sur la façon dont le riborégulateur régule le gène *thiM*, c'est pour cela on va utiliser la technique FRET à l'échelle de la molécule unique (smFRET). Cette technique sera utilisée au niveau des pauses transcriptionnelles puisqu'on s'attend que l'ARN adapte des structures particulières pour le ligand au niveau des sites des pauses. La technique smFRET permet de voir les changements structuraux et la dynamique de l'ARN (Roy et al., 2008). En effet, cette technique nous permet d'observer différentes conformations d'ARN en même temps. Cette méthode a été utilisée pour caractériser plusieurs étapes de la transcription telle que l'initiation (Chakraborty et al., 2012 ; Sreenivasan et al., 2016), alors qu'au niveau du complexe transcriptionnel cette méthode n'a pas été exploitée. Du point de vue de notre laboratoire, cela est dû à la difficulté d'incorporer un nucléotide fluorescent par l'ARNpol d'*E. coli* (travaux d'Adrien Chauvier, observation personnelle).

Notre laboratoire a développé une nouvelle méthode, qui consiste à avoir un complexe transcriptionnel fonctionnel fluorescent afin d'analyser la dynamique structurale de l'ARN grâce à la technique smFRET. Cette technique utilise une transcription par étape, dont un nucléotide modifié est incorporé et par la suite marqué avec un fluorophore. Le marquage de l'ARN s'effectue en présence de l'ARNpol c'est-à-dire au sein du complexe transcriptionnel qu'est formé grâce au barrage biotine-streptavidine (Chauvier *et al.*, 2017). En résumé, c'est une technique qui permet d'avoir un ARN avec deux fluorophores. La première étape à faire pour cette approche, c'est une transcription fluorescente couplée à des billes photoclivables.

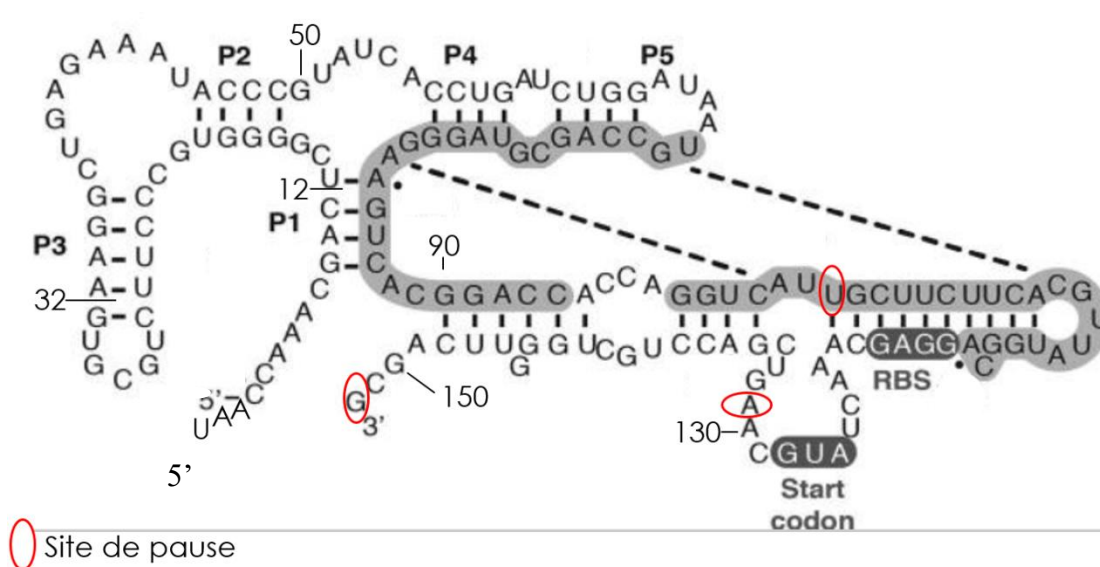


Figure 28 : Structure de *thiM* en présence de TPP. Les nucléotides impliqués dans la formation de la tige anti-séquestratrice (état ON) sont représentés en gris et indiqués par des lignes pointillées. Le site de liaison aux ribosomes (RBS) et les codons de démarrage AUG sont mis en évidence. La nomenclature indique les positions des nucléotides et les régions appariées (P1 – P5). Les cercles rouges représentent les sites de pauses de la polymérase (Bastet *et al.*, 2017).

4.2. Matériels et méthodes

4.2.1. Préparation des billes NHS

Pour préparer les billes, on prend la quantité nécessaire de NHS-billes pour le volume d'ADN. Par exemple 100 μ l de billes pour 100 μ l d'ADN. On prépare les billes une journée à l'avance de notre transcription. La préparation se base sur l'incubation des billes avec l'ADN pendant plusieurs heures dans une solution de couplage. Ensuite, les billes sont lavées pour enlever l'excédent d'ADN non lié, resuspendues dans du tampon Taopan 1X et conservées à 4°C.

4.2.2. Transcription fluorescente

La transcription se base sur l'utilisation d'un trinucéotide d'initiation UAA qui est lié au fluorophore cyanine 3. La transcription se fait par étapes et est couplée à des billes photoclivables (Figure 29). Pour l'essai de transcription par étape de *thiM*, nous avons utilisé une construction (Figure 30) modifiée pour commencer directement à la tige P1 de notre riborégulateur.

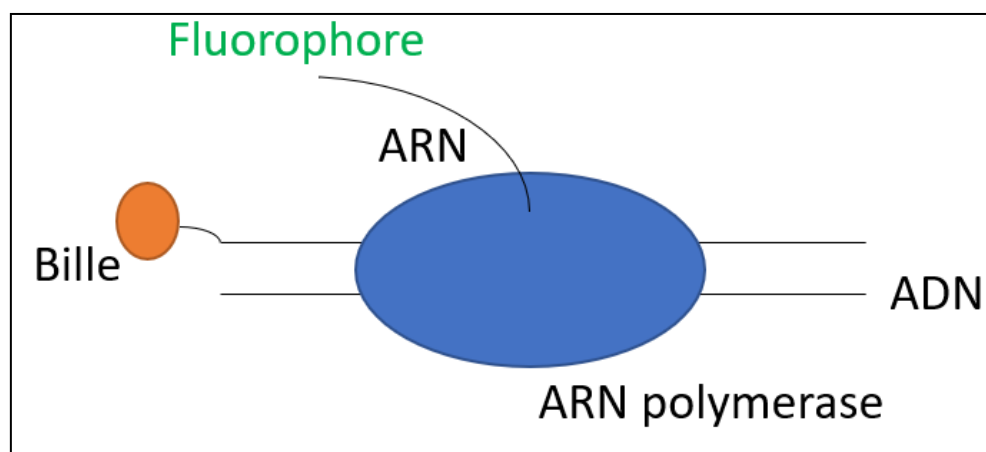


Figure 29 : Schéma simplifié de la transcription fluorescente couplée à des billes. L'ARN polymérase est représentée en bleu tandis que le brin d'ADN est lié à une bille.

La transcription est faite sur deux étapes pour notre riborégulateur *thiM* : La transcription jusqu'au EC-12 et l'ARN en pleine longueur. La transcription est réalisée de la même façon que dans le chapitre 2 (la section 2.2.1) , la différence c'est l'utilisation d'un ADN couplé à des billes.

La Figure 30 représente la séquence de *thiM* utilisée pour l'expérience de fluorescence. La séquence du promoteur LacUV5 est en vert et le trinucéotide d'initiation (TAA), en rose.

```
gggcaccccaggctttacactttatgcttcggctcgataatgtgtgTAACCAAACGACTCGGGGTGCCCTTCTGCGTGA  
AGGCTGAGAAATACCCGTATCACCTGATCTGGATATGCCAGCGTAGGGAAGTCA  
thiM-UAA-105nt
```

Figure 30 : Construction modifiée thiM-105-nt. La séquence du promoteur LacUV5 est représenté par la couleur verte. Le trinucléotide d'initiation en rose, le complexe d'élongation à la position 12 en jaune et le nom et la longueur de la séquence en bleu.

4.2.3. La technique smFRET

La technique FRET à l'échelle de la molécule unique (smFRET) est une technique biophysique qui permet de mesurer les distances entre des molécules à une échelle de 1 à 10 nanomètres. FRET est l'abréviation de « *Förster Resonance Energy Transfer* », un mécanisme permettant de décrire le transfert d'énergie entre deux chromophores. Avec la technique smFRET, nous utilisons le phénomène naturel qui se produit entre 2 fluorophores, appelés donneur et accepteur (Leblanc *et al.*, 2018). L'énergie d'émission du donneur est transférée à l'accepteur qui, par la suite, émet une fluorescence à proximité (Figure 31). Pour les expériences FRET, les donneurs et les accepteurs doivent être sélectionnés avec soin de manière à ce que le spectre d'émission du donneur chevauche partiellement le spectre d'absorption de l'accepteur. Les données smFRET permettent de déduire des changements conformationnels de transition par interprétation qualitative (Li *et al.*, 2020).

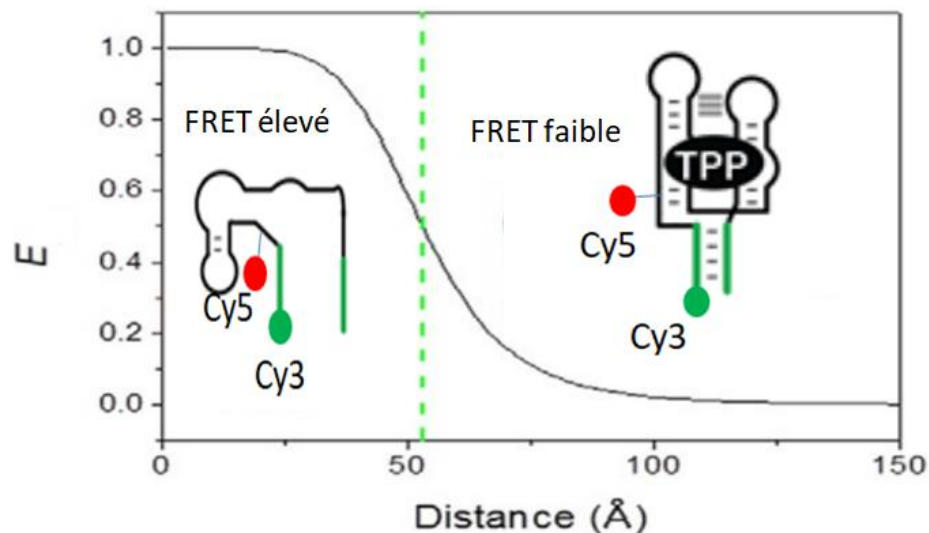


Figure 31 : Efficacité du FRET (E) en fonction de la séparation entre les fluorophores (\AA) .

Quand la tige boucle est absente, les deux fluorophores sont rapprochés, ce qui rend l'efficacité d'énergie du FRET ($E=1$) élevé . La formation de la tige boucle éloigne les deux fluorophores et l'énergie du FRET est basse. La ligne en pointillé verte représente la distance dont l'efficacité du FRET est à 50% adapté de (Shaw *et al.*, 2014)

4.3. Résultats

La figure 32 représente la transcription fluorescente couplée à des billes pour la construction de *thiM*-UAA-105.

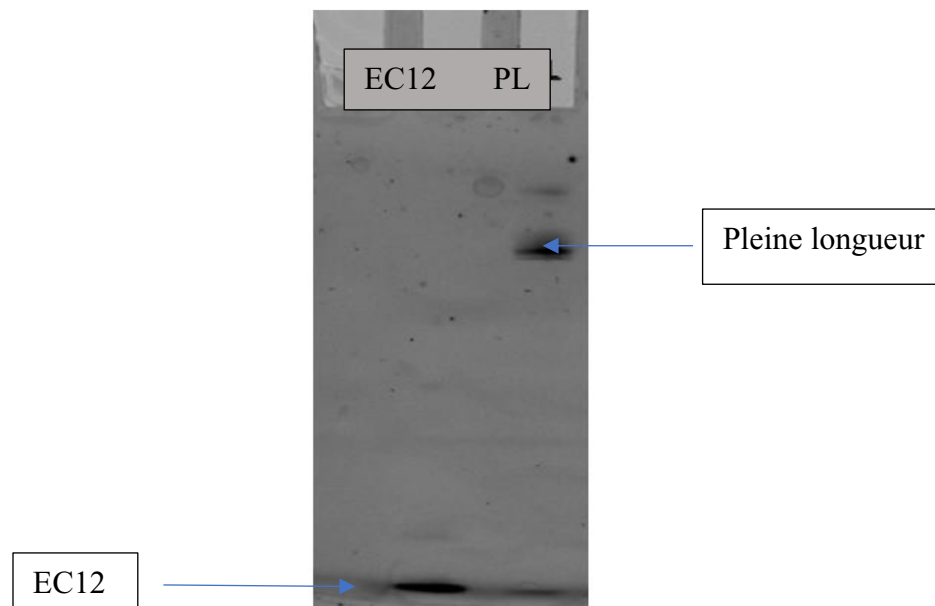


Figure 32 : La transcription fluorescente couplée à des billes. Dans la figure 32, EC12 représente la première étape de la transcription et PL, pour pleine longueur, représente l'ARN au complet.

Le résultat obtenu pour la transcription fluorescente couplée à des billes de sépharose constitue un bon début pour les expériences de la technique smFRET. En effet, l'utilisation de l'ARN fluorescent et immobilisé sur des billes permet d'avoir une structure intacte à étudier, puisqu'au moment de la purification de l'ARN, il y a moins de chance que le complexe transcriptionnel soit défait.

Durant ma maîtrise j'ai eu seulement le temps de faire la transcription, de ce fait je n'ai pas eu le temps de faire les prochaines étapes de la technique smFRET avec les transcrits fluorescent couplé à des billes pour voir le changement de structure de *thiM* à différentes positions. On va faire une transcription par étapes, mais cette fois, on utilisera les deux fluorophores cyanine 3 (Cy3) et cyanine 5 (Cy5) pour voir le changement de structure dépendamment de l'interaction entre ses deux fluorophores. En effet on va utiliser un autre nucléotide modifié qui va être incorporé et sera marqué après avec la cyanine 5.

On fixera le riborégulateur *thiM* sur une surface, son signal de fluorescence sera suivi dans le temps, fournissant ainsi des informations de repliement en temps réel. Il existe de nombreuses façons de fixer l'ARN sur des lames de microscope. On va utiliser la méthode qui consiste à combiner un brin d'ARN synthétique contenant de la biotine avec un complexe biotine-streptavidine préalablement incubé sur une lame de verre. Les signaux fluorescents des fluorophores seront détectés par microscopie. Le fluorophore donneur (Cy3) est excité par un laser avec une longueur d'onde spécifique. Une méthode d'excitation utilisant la réflexion interne totale (TIR) permet de créer un champ d'excitation à l'aide d'une onde évanescente. Le miroir dichroïque permet de séparer les spectres d'émission du donneur et de l'accepteur (Cy5). Une caméra CCD (dispositif à couplage de charge) permet de photographier simultanément l'émission de deux fluorophores, ce qui nous permet de calculer la valeur FRET dans le temps (Roy *et al.*, 2008 ; Shaw *et al.*, 2014).

Dans cette expérience, on s'attend à observer différentes structures adoptées par *thiM* au niveau des pauses transcriptionnelles. En effet, le riborégulateur *thiM* possède plusieurs structures intermédiaires au cours de la transcription avant d'adopter la structure finale. Grâce au smFRET, il sera possible d'étudier ces différentes conformations et voir l'effet des pauses sur l'orientation de la structure de l'ARN.

CHAPITRE 5

DISCUSSION ET CONCLUSION

Les travaux présentés dans ce mémoire avaient pour but de mieux comprendre l'importance de la structure et du repliement des riborégulateurs et leur impact sur le résultat de l'expression génique. Plus spécifiquement, ces études ont été réalisées sur deux riborégulateurs liant le TPP, pour lesquels il existait peu d'information.

Les deux riborégulateurs étudiés sont *thiB* et *thiM*. D'abord, une étude structurale de *thiB* *in vitro* a été faite. Nous avons utilisé la technique SHAPE sur un ARN natif. Pendant une année, plusieurs expériences ont été réalisées. Chaque fois, on a optimisé la technique en modifiant quelques paramètres au niveau du protocole SHAPE sur un ARN transcrit en condition native. On a augmenté la concentration de l'ARN polymérase et le facteur sigma, puis on a augmenté la durée de migration des échantillons afin de mieux séparer les bandes et ainsi faciliter la quantification du gel et la prédiction de la structure par un logiciel informatique. De plus, on a utilisé différents types de purification et d'amorces marqués radioactivement. Malheureusement, ce travail n'a pas mené à des résultats fiables et donc un changement de stratégie s'est imposé. Par conséquent, on s'est dirigé vers une étude de la structure de *thiB* en utilisant la RNase H et la cartographie en ligne au magnésium. Cette première technique utilise différentes sondes qui ont permis de définir certaines régions simples et doubles brins de l'ARN, permettant d'avoir une image de la structure réelle du riborégulateur. On a également réalisé l'expérience de K_{switch} pour confirmer le résultat obtenu par RNase H vis-à-vis de l'affinité au ligand pour EC83 et EC88 avec la sonde 41. Le résultat de K_{switch} obtenue pour EC-83, montre que EC-83 possède une affinité très faible pour son ligand ce qui correspond à une confirmation des résultats d'Adrien Chauvier. Le riborégulateur *thiB* transcrit jusqu'à la position 83 ne possède pas une structure d'aptamère complète, ce qui le rend pas suffisamment stable pas suffisamment stable pour lier son ligand avec une haute affinité.

La deuxième technique utilisée est la technique de cartographie en ligne au magnésium au niveau de la région P1 de *thiB*, précisément en utilisant des ARN tronqués allant de la position 83 à la position 88. En effet, la cartographie en ligne permet de connaître l'affinité du riborégulateur à son ligand TPP et la concentration de TPP requise pour changer d'une structure à une autre. Jusqu'à présent, on a réussi à avoir les résultats des ARN tronqués 84, 86 et 87 qui indiquent que l'affinité de *thiB* pour son ligand augmente lorsque l'ARN est allongé de la position 84 à 87. Avec les résultats manquants des ARNs tronqués 83, 85 et 88, notre observation sera confirmée et on aura remarqué que la valeur de K_D du tronqué 83 est la plus élevée parmi tous ce qui explique l'affinité faible à son ligand tel que confirmé au niveau du K_{switch} de EC-83.

Finalement, pour l'étude de la structure du riborégulateur *thiM* on a utilisé la technique du smFRET. En effet, le choix de cette technique est basé sur son importance dans l'étude du mécanisme de repliement de l'ARN qui dépend de la cinétique de transcription, alors qu'avec les autres méthodes on ne peut pas suivre la cinétique et on aura seulement la structure finale. Cette méthode souligne ainsi l'importance du processus de transcription pour étudier la structure des riborégulateurs. La première étape de la technique est déjà réalisée, elle consiste à faire la transcription fluorescente couplée à des billes. La prochaine étape sera d'étudier la structure avec la technique smFRET au niveau des trois pauses. On aura ainsi l'information sur le repliement cotranscriptionnel de *thiM* en absence et présence de TPP.

Il serait donc intéressant dans le futur d'étudier la structure de *thiB* et *thiM* *in vivo*. En effet, les expériences faites *in vitro* en conditions natives pour se rapprocher le plus possible des conditions réelles se déroulant au sein de la bactérie restent insuffisantes pour être certaines qu'il présente les conditions dans la bactérie. On peut donc combiner la technique SHAPE avec le séquençage (SHAPE-Seq) *in vivo* pour avoir la structure réelle de l'ARN pleine longueur de *thiB* (Takahashi et al., 2016). De même, n'oublions pas que ces expériences *in vivo* sont principalement réalisées en milieu riche, ce qui ne permet pas de comparer la structure en présence et absence de ligand. La situation idéale est de changer les conditions de croissance.

Enfin, pour voir l'effet des pauses transcriptionnelles sur la structure du riborégulateur, on peut créer des blocages transcriptionnels *in vivo* (Proshkin *et al.*, 2010) au niveau des pauses déjà identifiées *in vitro* et observer ainsi leur effet dans différentes conditions comme la présence ou l'absence du ligand.

ANNEXE

Tableau A1 : Amorce radioactivement marquée utilisée pour la technique SHAPE

Oligonucléotides	Séquences 5'-3'
3340	TCCCTTCGCCGGCGTTATCC
3341	CCTTCGCCGGCGTTATCCGG
3342	TTCGCCGGCGTTATCCGGAT
3343	TCCCTTCGCCGGCGTT
3375	TTCGCCGGCGTTATCC
2440	GCCTCAAATCCCTTCGCCGG

Tableau A2 : Sondes utilisées pour la technique de RNase H

Sondes	Séquences 5'-3'
2478 AC	CGACGGGTAT
2482 AC	GGTTCGACGG
2492 AC	ATCCGGATCA
2500 AC	CCGGCGTTAT
2505 AC	CTTCGCCGGC

Tableau A3 : Séquence d'amorce utilisée pour les différentes constructions

Les nucléotides en minuscules présentent la séquence du promoteur lacUV5 et 5Biosg indique la présence de biotine.

Oligonucléotides	Séquences 5'-3'
275 AL	gggcaccccaggctttacactttatgcttccggctcgtataatgtgtggGTTCTCAAC GGGGTGCCAC
2889 JFN	AAATCCCTTCGCCGGCG
2733 AML	CAAATCCCTTCGCCGGCG
2890 JFN	TCAAATCCCTTCGCCGGC
2891 JFN	CTCAAATCCCTTCGCCGGC
3053 JFN	CCTCAAATCCCTTCGCCGGC
2440 AC	GCCTCAAATCCCTTCGCCGG
1579 JFN	/5Biosg/AGGAGCCTCAAATCCCTTCG
1578 JFN	/5Biosg/TGAGAAGGAGCCTCAAATCCC

Tableau A4 : Amorce utilisée pour les différentes constructions d'ARN

Constructions	Oligonucléotides
Tronqué 83	275 AL 2889 JFN
Tronqué 84	275 AL-2733 AML
Tronqué 85	275 AL-2890 JFN
Tronqué 86	275 AL-2891 JFN
Tronqué 87	275 AL-3053 JFN
Tronqué 88	275 AL-2440 AC
Complexe d'élongation 83	275AL-1579 JFN
Complexe d'élongation 88	275 AL-1578 JFN

BIBLIOGRAPHIE

- Ames, T. D., & Breaker, R. R. (2011). Bacterial aptamers that selectively bind glutamine. *RNA Biology*, 8(1), 82-89. <https://doi.org/10.4161/rna.8.1.13864>
- Artsimovitch, I., & Landick, R. (2000). Pausing by bacterial RNA polymerase is mediated by mechanistically distinct classes of signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(13), 7090-7095. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.13.7090>
- Bellion, E., Lash, T. D., & Mckellar, B. R. (1983). Transport of thiamine and 4-methyl-5-hydroxyethylthiazole by salmonella typhimurium. *Elsevier*, 735, 331-336.
- Bettendorff, L., & Wins, P. (2009). Thiamin diphosphate in biological chemistry: New aspects of thiamin metabolism, especially triphosphate derivatives acting other than as cofactors. *FEBS Journal*, 276(11), 2917-2925. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07019.x>
- Birney, E., Stamatoyannopoulos, J. A., Dutta, A., Guigó, R., Gingeras, T. R., Margulies, E. H., ... De Jong, P. J. (2007). Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature*, 447(7146), 799-816. <https://doi.org/10.1038/nature05874>
- Borukhov, S., Sagitov, V., & Goldfarb, A. (1993). Transcript cleavage factors from E. coli. *Cell*, 72(3), 459-66. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90121-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90121-6)
- Borukhov, Sergei, Lee, J., & Laptenko, O. (2005). Bacterial transcription elongation factors: New insights into molecular mechanism of action. *Molecular Microbiology*, 55(5), 1315-1324. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04481.x>
- Breaker, R. R. (2012). Riboswitches and the RNAWorld. *Cold Spring Harb Perspect Biology*, 36(3), 1-23.
- Browning, D. F., & Busby, S. J. W. (2016). Local and global regulation of transcription initiation in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 14(10), 638-650. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.103>
- Caron, M. P., Bastet, L., Lussier, A., Simoneau-Roy, M., Massé, E., & Lafontaine, D. A. (2012). Dual-acting riboswitch control of translation initiation and mRNA decay. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(50). <https://doi.org/10.1073/pnas.1214024109>
- Chakraborty, A., Wang, D., Ebright, Y.W., Korlann, Y., Kortkhonja, E., Kim, T., Chowdhury, S., Wigneshweraraj, S., Irschik, H., Jansen, R., et al. (2012). Opening and closing of the bacterial RNA polymerase clamp. *Science* 337, 591-595.
- Chalissery, J., Banerjee, S., Bandey, I., & Sen, R. (2007). Transcription Termination Defective Mutants of Rho: Role of Different Functions of Rho in Releasing RNA from the Elongation

Complex. *Journal of Molecular Biology*, 371(4), 855-872. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.06.013>

Chan, C. L., & Landick, R. (1993). Dissection of the his leader pause site by base substitution reveals a multipartite signal that includes a pause RNA hairpin. *Journal of Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1993.1482>

Chan, C. L., Wang, D., & Landick, R. (1997). Multiple interactions stabilize a single paused transcription intermediate in which hairpin to 3' end spacing distinguishes pause and termination pathways. *Journal of Molecular Biology*, 268(1), 54-68. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.0935>

Chauvier, A., Picard-Jean, F., Berger-Dancouse, J. C., Bastet, L., Naghdi, M. R., Dubé, A., ... Lafontaine, D. A. (2017). Transcriptional pausing at the translation start site operates as a critical checkpoint for riboswitch regulation. *Nature Communications*, 8. <https://doi.org/10.1038/ncomms13892>

Chauvier Adrien and Lafontaine Daniel. (2015). DNA-protein interactions: Principles and protocols: Fourth Edition. *DNA-Protein Interactions: Principles and Protocols: Fourth Edition*, 1334, 1–347. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2877-4>

Chen, L. L. (2006). Envisioning a new cultural topography: Linking chinese global cities. *Tamkang Review*, 36(3), 1-23.

Ciszak, E. M., Korotchikina, L. G., Dominiak, P. M., Sidhu, S., & Patel, M. S. (2003). Structural basis for flip-flop action of thiamin pyrophosphate-dependent enzymes revealed by human pyruvate dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry*, 278(23), 21240-21246. <https://doi.org/10.1074/jbc.M300339200>

Crick, F., & Watson, J. (1953). © 1953 Nature Publishing Group.

Cromie, M. J., Shi, Y., Latifi, T., & Groisman, E. A. (2006). An RNA Sensor for Intracellular Mg²⁺. *Cell*, 125(1), 71-84. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.01.043>

Derrien, T., & Guigó, R. (2011). De longs ARN non codants activateurs de la transcription des gènes. *Médecine/Sciences*, 27(4), 359-361. <https://doi.org/10.1051/medsci/2011274009>

Ding, Y., Kwok, C. K., Tang, Y., Bevilacqua, P. C., & Assmann, S. M. (2015). Genome-wide profiling of in vivo RNA structure at single-nucleotide resolution using structure-seq. *Nature Protocols*, 10(7), 1050-1066. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.064>

Eddy, S. R. (2001). Non-coding RNA genes and the modern RNA world. *Nature Reviews Genetics*, 2(12), 919-929. <https://doi.org/10.1038/35103511>

Edwards, T. E., & Ferré-D'Amaré, A. R. (2006). Crystal Structures of the Thi-Box Riboswitch Bound to Thiamine Pyrophosphate Analogs Reveal Adaptive RNA-Small Molecule Recognition. *Structure*, 14(9), 1459-1468. <https://doi.org/10.1016/j.str.2006.07.008>

Epshtein, V., Cardinale, C. J., Ruckenstein, A. E., Borukhov, S., & Nudler, E. (2007). An

Allosteric Path to Transcription Termination. *Molecular Cell*, 28(6), 991-1001. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.10.011>

Grundy, F. J., Winkler, W. C., & Henkin, T. M. (2002). tRNA-mediated transcription antitermination in vitro: Codon-anticodon pairing independent of the ribosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(17), 11121-11126. <https://doi.org/10.1073/pnas.162366799>

Havill, J. T., Bhatiya, C., Johnson, S. M., Sheets, J. D., & Thompson, J. S. (2014). A new approach for detecting riboswitches in DNA sequences. *Bioinformatics*, 30(21), 3012-3019. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu479>

Henkin, F. J. G. and T. M. (2003). THE T BOX AND S BOX TRANSCRIPTION TERMINATION CONTROL SYSTEMS. *Frontiers in Bioscience* 8, d20-31.

Jacob, F., & Monod, J. (1961). Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *Journal of Molecular Biology*, 3(3), 318-356. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(61\)80072-7](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(61)80072-7)

Jenny L. Baker, Narasimhan Sudarsan, Zasha Weinberg, Adam Roth, Randy B. Stockbridge, and R. R. B. (2012). Widespread Genetic Switches and Toxicity Resistance Proteins for Fluoride. *National Institutes Of Health*, 335(6065), 233-235. <https://doi.org/10.1126/science.1215063>. Widespread

Jia, X., Zhang, J., Sun, W., He, W., Jiang, H., Chen, D., & Murchie, A. I. H. (2013). Riboswitch control of aminoglycoside antibiotic resistance. *Cell*, 152(1-2), 68-81. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.12.019>

Jin, D. J., Burgess, R. R., Richardson, J. P., & Gross, C. A. (1992). Termination efficiency at rho-dependent terminators depends on kinetic coupling between RNA polymerase and rho. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(4), 1453-1457. <https://doi.org/10.1073/PNAS.89.4.1453>

Kang, J. Y., Mishanina, T. V, Landick, R., & Darst, S. A. (2019). Mechanisms of Transcriptional Pausing in Bacteria. *Journal of Molecular Biology*, 431(20), 4007-4029. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.07.017>

Kim, J. N., Roth, A., & Breaker, R. R. (2007). Guanine riboswitch variants from *Mesoplasma florum* selectively recognize 2'-deoxyguanosine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(41), 16092-16097. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705884104>

Kireeva, M. L., & Kashlev, M. (2009). Mechanism of sequence-specific pausing of bacterial RNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(22), 8900-8905. <https://doi.org/10.1073/pnas.0900407106>

Komissarova, N., & Kashlev, M. (1997a). RNA polymerase switches between inactivated and activated states by translocating back and forth along the DNA and the RNA. *Journal of Biological Chemistry*, 272(24), 15329-15338. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.24.15329>

- Komissarova, N., & Kashlev, M. (1997b). Transcriptional arrest: Escherichia coli RNA polymerase translocates backward, leaving the 3' end of the RNA intact and extruded. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(5), 1755-1760. Consulté à l'adresse <https://doi.org/10.1073/pnas.94.5.1755>
- Kriner, M. A., Sevostyanova, A., & Groisman, E. A. (2016). Learning from the Leaders: Gene Regulation by the Transcription Termination Factor Rho. *Trends in Biochemical Sciences*, 41(8), 690-699. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.05.012>
- Kuznedelov, K., Minakhin, L., Niedziela-Majka, A., Dove, S. L., Rogulja, D., Nickels, B. E., ... Severinov, K. (2002). A role for interaction of the RNA polymerase flap domain with the σ subunit in promoter recognition. *Science*, 295(5556), 855-857. <https://doi.org/10.1126/science.1066303>
- Laurène Bastet, Adrien Chauvier, Navjot Singh, Antony Lussier, Anne-Marie Lamontagne, Karine Prévost, Eric Masse, Joseph T. Wade, and D. L. (2017). Translational control and Rho-dependent transcription termination are intimately linked in riboswitch, 45(12), 7474-7486. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx434>
- Leblanc, S. J., Kulkarni, P., & Weninger, K. R. (2018). Single molecule FRET: A powerful tool to study intrinsically disordered proteins. *Biomolecules*, 8(4). <https://doi.org/10.3390/biom8040140>
- Li, C. chen, Li, Y., Zhang, Y., & Zhang, C. yang. (2020). Single-molecule fluorescence resonance energy transfer and its biomedical applications. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 122, 115753. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115753>
- Lieberman, J. A., & Wedekind, J. E. (2012). Riboswitch structure in the ligand-free state. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 3(3), 369-384. <https://doi.org/10.1002/wrna.114>
- Ma, C., Yang, X., & Lewis, P. J. (2016). Bacterial Transcription as a Target for Antibacterial Drug Development. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(1), 139-160. <https://doi.org/10.1128/mnbr.00055-15>
- Mandal, M., Boese, B., Barrick, J. E., Winkler, W. C., & Breaker, R. R. (2003). Riboswitches control fundamental biochemical pathways in Bacillus subtilis and other bacteria. *Cell*, 113(5), 577-586. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00391-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00391-X)
- Mandal, M., & Breaker, R. R. (2004). Adenine riboswitches and gene activation by disruption of a transcription terminator. *Nature Structural and Molecular Biology*, 11(1), 29-35. <https://doi.org/10.1038/nsmb710>
- Mandal, M., Lee, M., Barrick, J. E., Weinberg, Z., Emilsson, G. M., Ruzzo, W. L., & Breaker, R. R. (2004). A glycine-dependent riboswitch that uses cooperative binding to control gene expression. *Science*, 306(5694), 275-279. <https://doi.org/10.1126/science.1100829>
- Marr, M. T., & Roberts, J. W. (2000). Function of transcription cleavage factors GreA and GreB at a regulatory pause site. *Molecular Cell*, 6(6), 1275-1285. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)00126-X](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)00126-X)

- Mccown, P. J., Corbino, K. A., Stav, S., Sherlock, M. E., & Breaker, R. R. (2017). Riboswitch diversity and distribution. *Rna*, 23(7), 995-1011. <https://doi.org/10.1261/rna.061234.117>
- Merino, E. J., Wilkinson, K. A., Coughlan, J. L., & Weeks, K. M. (2005). RNA structure analysis at single nucleotide resolution by Selective 2'-Hydroxyl Acylation and Primer Extension (SHAPE). *Journal of the American Chemical Society*, 127(12), 4223-4231. <https://doi.org/10.1021/ja043822v>
- Meyer, M. M., Roth, A., Chervin, S. M., Garcia, G. A., & Breaker, R. R. (2008). Confirmation of a second natural preQ1 aptamer class in Streptococcaceae bacteria. *Rna*, 14(4), 685-695. <https://doi.org/10.1261/rna.937308>
- Miranda-Ríos, J. (2007). The THI-box Riboswitch, or How RNA Binds Thiamin Pyrophosphate. *Structure*, 15(3), 259-265. <https://doi.org/10.1016/j.str.2007.02.001>
- Mironov, A. S., Gusarov, I., Rafikov, R., Lopez, L. E., Shatalin, K., Kreneva, R. A., ... Nudler, E. (2002). Sensing small molecules by nascent RNA: A mechanism to control transcription in bacteria. *Cell*, 111(5), 747-756. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)01134-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)01134-0)
- Mitra, P., Ghosh, G., & Sen, R. (2017). Rho Protein : Roles and Mechanisms.
- Morita, M. T., Tanaka, Y., Kodama, T. S., Kyogoku, Y., Yanagi, H., & Yura, T. (1999). Translational induction of heat shock transcription factor σ 32. *Genes & Development*, 13(6), 655-665.
- Nahvi, A., & Green, R. (2013). *Structural analysis of RNA backbone using in-line probing. Methods in Enzymology* (1^{re} éd., Vol. 530). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420037-1.00022-1>
- Nahvi, A., Sudarsan, N., Ebert, M. S., Zou, X., Brown, K. L., & Breaker, R. R. (2002). Genetic control by a metabolite binding mRNA. *Chemistry and Biology*, 9(9), 1043-1049. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(02\)00224-7](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(02)00224-7)
- Nechooshtan, G., Elgrably-Weiss, M., Sheaffer, A., Westhof, E., & Altuvia, S. (2009). A pH-responsive riboregulator. *Genes and Development*, 23(22), 2650-2662. <https://doi.org/10.1101/gad.552209>
- Nelson, J. W., Sudarsan, N., Furukawa, K., Weinberg, Z., Wang, J. X., & Breaker, R. R. (2013). Riboswitches in eubacteria sense the second messenger c-di-AMP. *Nature Chemical Biology*, 9(12), 834-839. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1363>
- Nudler, A. S. and E. (2013). Une décennie de Riboswitches _ Elsevier Enhanced Reader.pdf.
- ONI [En ligne] // Single-molecule FRET microscopy. - 10 04 2020. - <https://oni.bio/single-molecule-fret-microscopy..>
- Opalka, N., Chlenov, M., Chacon, P., Rice, W. J., Wriggers, W., & Darst, S. A. (2003). Structure and function of the transcription elongation factor GreB bound to bacterial RNA polymerase. *Cell*, 114(3), 335-345. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00600-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00600-7)

- Padhi, S., Pradhan, M., Bung, N., Roy, A., & Bulusu, G. (2019). Journal of Molecular Graphics and Modelling TPP riboswitch aptamer : Role of Mg ²⁺ ions , ligand unbinding , and allostery. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 88, 282-291. <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2019.01.015>
- Proshkin, S., Rahmouni, A.R., Mironov, A., and Nudler, E. (2010). Cooperation between translating ribosomes and RNA polymerase in transcription elongation. *Science* 328, 504–508.
- Regulski, E. E., Moy, R. H., Weinberg, Z., Barrick, J. E., Yao, Z., Ruzzo, W. L., & Breaker, R. R. (2008). A widespread riboswitch candidate that controls bacterial genes involved in molybdenum cofactor and tungsten cofactor metabolism. *Molecular Microbiology*, 68(4), 918-932. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06208.x>
- Reynolds, R., Bermúdez-Cruz, R. M., & Chamberlin, M. J. (1992). Parameters affecting transcription termination by Escherichia coli RNA polymerase. I. Analysis of 13 rho-independent terminators. *Journal of Molecular Biology*, 224(1), 31-51. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(92\)90574-4](https://doi.org/10.1016/0022-2836(92)90574-4)
- Rodionov, D. A., Mironov, A., & Gelfand, M. (2003). Comparative Genomics of Thiamin Biosynthesis in Procaryotes . Comparative Genomics of Thiamin Biosynthesis in Procaryotes, (January). <https://doi.org/10.1074/jbc.M208965200>
- Roth, A., Winkler, W. C., Regulski, E. E., Lee, B. W. K., Lim, J., Jona, I., ... Breaker, R. R. (2007). A riboswitch selective for the queuosine precursor preQ1 contains an unusually small aptamer domain. *Nature Structural and Molecular Biology*, 14(4), 308-317. <https://doi.org/10.1038/nsmb1224>
- Rothman-Denes, L. B. (2013). Structure of Escherichia coli RNA polymerase holoenzyme at last. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(49), 19662-19663. <https://doi.org/10.1073/pnas.1320604110>
- Roy Rahul 1, 2, Sungchul Hohng³, and Taekjip Ha^{1, 2, 4}. (2008). A Practical Guide to Single Molecule FRET. *National institutes of health*, 44(6), 21. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1208.A>
- Santangelo, T. J., & Artsimovitch, I. (2012). *sign*, 9(5), 319-329. Consulté à l'adresse <https://doi.org/10.1038/nrmicro2560.Termination>
- Santangelo, T. J., & Roberts, J. W. (2004). Forward translocation is the natural pathway of RNA release at an intrinsic terminator. *Molecular Cell*, 14(1), 117-126. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(04\)00154-6](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(04)00154-6)
- Serganov, A., Polonskaia, A., Phan, A.T., Breaker, R.R., and Patel, D. J. (2006). Structural basis for gene regulation by a thiamine pyrophosphate-sensing riboswitch. *Nature*, 176(10), 139-148. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>
- Serganov, A. (2009). The long and the short of riboswitches. *Bone*, 23(1), 1-7. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- Shaw, E., St-Pierre, P., McCluskey, K., Lafontaine, D. A., & Penedo, J. C. (2014). *Using sm-*

FRET and denaturants to reveal folding landscapes. Methods in Enzymology (1^{re} éd., Vol. 549). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801122-5.00014-3>

Soukup, G. A., & Breaker, R. R. (1999). Design of allosteric hammerhead ribozymes activated by ligand-induced structure stabilization. *Structure*, 7(7), 783-791. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(99\)80102-6](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(99)80102-6)

Sreenivasan, R., Heitkamp, S., Chhabra, M., Saecker, R.M., Lingeman, E., Poulos, M., McCaslin, D.R., Capp, M.W., Artsimovitch, I., and Record, M.T. (2016). FRET Characterization of DNA Wrapping in Closed and Open Escherichia coli RNA Polymerase - λ PR Promoter Complexes. *Biochemistry*

Steven T. Rutherford, Justin J. Lemke, Catherine E. Vrentas, Tamas Gaal, Wilma Ross, and R. L. G. (2007). Effects of DksA, GreA, and GreB on transcription initiation: insights into the mechanisms of factors that bind in the secondary channel channel of RNA polymerase. *Bone*, 23(1), 1-7. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.956839>

Sudarsan, N., Lee, E. R., Weinberg, Z., Moy, R. H., Kim, J. N., Link, K. H., & Breaker, R. R. (2008). Riboswitches in eubacteria sense the second messenger cyclic Di-GMP. *Science*, 321(5887), 411-413. <https://doi.org/10.1126/science.1159519>

Sudarsan, Narasimhan, Wickiser, J. K., Nakamura, S., Ebert, M. S., & Breaker, R. R. (2003). An mRNA structure in bacteria that controls gene expression by binding lysine. *Genes and Development*, 17(21), 2688-2697. <https://doi.org/10.1101/gad.1140003>

Takahashi, M. K., Watters, K. E., Gasper, P. M., Abbott, T. R., Carlson, P. D., Chen, A. A., & Lucks, J. B. (2016). Using in-cell SHAPE-Seq and simulations to probe structure – function design principles of RNA transcriptional regulators, 920-933. <https://doi.org/10.1261/rna.054916.115>.

Thore, S., Leibundgut, M., & Nenad, B. (2006). Structure of the Eukaryotic Thiamine. *Science*, 312(May), 1208-1211. <https://doi.org/10.1126/science.1128451>

Touloukhonov, I., & Landick, R. (2004). Erratum: The Flap Domain Is Required for Pause RNA Hairpin Inhibition of Catalysis by RNA Polymerase and Can Modulate Intrinsic Termination (Molecular Cell 12 (1125-1136)). *Molecular Cell*, 13(2), 299. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(04\)00032-2](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(04)00032-2)

Webb, E., Claas, K., & Downs, D. (1998). thiBPQ encodes an ABC transporter required for transport of thiamine and thiamine pyrophosphate in Salmonella typhimurium. *Journal of Biological Chemistry*, 273(15), 8946-8950. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.15.8946>

Weeks, L. J. and, & Kevin. (2011). SHAPE-Directed RNA Secondary Structure Prediction. *National Institutes of Health*, 52(2), 150–158. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2010.06.007>.SHAPE-Directed

Weixlbaumer, A., Leon, K., Landick, R., & Darst, S. A. (2013). Structural basis of transcriptional pausing in bacteria. *Cell*, 152(3), 431-441.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.12.020>

Wilkinson, K. A., Merino, E. J., & Weeks, K. M. (2006). Selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension (SHAPE): quantitative RNA structure analysis at single nucleotide resolution. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.249>

Willey J.M., Sherwood, L.M., and Woolverto. Prescott, Harley and Klein's Microbiology, 7th edn. [Ouvrage]. - New York : McGraw-Hill Higher Education, 2008. - Vol. 7th edn.

Winkler, W. C., Cohen-chalamish, S., & Breaker, R. R. (2002). An mRNA structure that controls gene expression by binding FMN, 2002.

Winkler, W. C., Nahvi, A., Sudarsan, N., Barrick, J. E., & Breaker, R. R. (2003). An mRNA structure that controls gene expression by binding S-adenosylmethionine. *Nature Structural Biology*, 10(9), 701-707. <https://doi.org/10.1038/nsb967>

Winkler, W., Nahvi, A., & Breaker, R. R. (2002). Thiamine derivatives bind messenger RNAs directly to regulate bacterial gene expression. *Nature*, 419(6910), 952-956. <https://doi.org/10.1038/nature01145>

W. Roberts Jefferey. (1969). Termination Factor for RNA synthesis. *Nature*, 224, 177–178. <https://doi.org/10.1038/224488a0>

Zhang, G., Campbell, E. A., Minakhin, L., Richter, C., Severinov, K., & Darst, S. A. (1999). Crystal structure of thermus aquaticus core RNA polymerase at 3.3 Å resolution. *Cell*, 98(6), 811-824. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81515-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81515-9)

